FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1970 N° 987

THÈSE

pour le

DOCTORAT EN MÉDECINE

(diplôme d'État)

PAR

Marie José LACOMBE

née le 6 juillet 1945 à LYON 7e

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 30 JUIN 1970

ÉTUDE DE LA FIBRINOLYSE AU COURS DES MALADIES THROMBOEMBOLIQUES

PRÉSIDENT : MONSIEUR JEAN BERNARD, PROFESSEUR

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551501_0015

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

THESE

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

PAR

LACOMBE Marie José

Présentée et soutenue publiquement le : 30 Juin 1970

ETUDE DU SYSTEME FIBRINOLYTIQUE AU COURS DES MALADIES THROMBOEMBOLIQUES

Président : Monsieur le Professeur Jean BERNARD

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mes Parents

A mes Soeurs,

A mes Frères,

A mon Beau-Frère,

A mes Neveux et Nièces,

Et à toute ma famille.

A mon Président de thèse et à mon Maître,

Monsieur le Professeur Jean BERNARD.

En témoignage de ma reconnaissance pour l'accueil qu'il m'a toujours réservé dans son service.

A Monsieur le Professeur J. CAEN

Qui m'a accueillie dans son service

et m'a permis de réaliser ce travail.

A Madame le Docteur Y.SULTAN

Qui m'a inspiré le sujet de cette Thèse, m'en a fourni les éléments et m'a fait bénéficier de la richesse de son enseignement.

En témoignage de ma respectueuse admiration et de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur J.P. LEVY

A Monsieur le Docteur B.VARET

A Mademoiselle le Docteur F.MIELOT

Et toutes les personnes avec qui je travaille désormais à

l'Hôpital COCHIN et SAINT VINCENT DE PAUL.

A toutes les Laborantines du service,

en reconnaissance de l'aide précieuse
qu'elles m'ont apportée par les conseils
de leur grande expérience.

P L A N

I - Introduction

II - Rappel physiologique et rôle de la fibrinolyse

III - Hypothèses étiologiques des maladies thromboemboliques

- Rôle de l'altération de la paroi vasculaire : l'infection
- Rôle des plaquettes - rôle du magnésium
- Désordres plasmatiques

  . Concept d'hypercoagulabilité

  . Déficit en antithrombine

  . Augmentation des inhibiteurs de la fibrinolyse

  . Diminution des cativateurs du plasminogène

IV - Matériels et méthodes

Matériel d'étude

a) les témoins

b) deux observations de maladies thromboemboliques

c) trois malades ayant présenté des thromboses veineuses et dont les fonctions plaquettaires étaient normales

d) un déficit en facteur XII (Hageman) porteur d'un cancer du poumon

./...

Technique

a) techniques de laboratoire utilisées :

- Lyse des euglobulines
- Méthode des plaques de fibrine

  . Dosage du plasminogène par l'étude de sa résistance à la stréptokinase

  . Dosage des produits de dégradation du fibrinogène par une méthode immunologique

b) Principe expérimental de l'anoxie - modalités des prélèvements.

V - Résultats

VI - Discussion

VII - Conclusion

INTRODUCTION

Nous voulons entendre par "maladie thromboembolique" une forme particulière de maladies thrombosantes caractérisées par certains traits singuliers qui leur donnent leur individualité.

Ce sont des maladies veineuses, en apparences primitives :

- survenant chez des sujets jeunes, 20-25ans, actifs, des deux sexes,

- thromboses extensives s'étendant aux gros vaisseaux profonds, veines iliaques, veine cave,

- la répétition des accidents emboliques et tout particulièrement pulmonaires, conduisant à un tableau extrêmement grave d'insuffisance cardiaque ventriculaire droite aiguë,

- la difficulté d'équilibrer les traitements anticoagulants par les antivitamines K, due à une variabilité extrême des réponses d'un moment à l'autre,

- l'échec des tentatives de ligature de la veine cave inférieure qui n'ont pas diminué les risques d'embolies pulmonaires et l'évolution vers l'insuffisance cardiaque ventriculaire droite,

- la gravité de la maladie justifiant les tentatives de greffes veineuses (Dacron) (67),

- enfin, la complète ignorance où nous sommes dans la compréhension du mécanisme déclenchant de tels accidents.

./...

Il apparaît actuellement que certaines maladies veineuses thrombosantes peuvent évoluer de façon plus ou moins latentes, sans manifestation clinique, chez des sujets ne répondant à aucune des conditions étiologiques habituelles; la question est même posée de savoir, dans quelle mesure, chez certains individus, actifs et apparemment sains de petites embolies répétées peuvent se produire et être tolérées par l'organisme, grâce à des mécanismes naturels de défense.

Même si cette opinion demande encore confirmation, il est de fait que la maladie thromboembolique peut en réalité "frapper n'importe qui, n'importe quand".

Depuis Wirchow la lésion de la paroi vasculaire étant considérée comme la principale cause des thromboses, les plaquettes adhérant à l'endothélium, puis s'agrégant de proche en proche, déclenchant une coagulation plasmatique.

Mais la maladie thromboembolique atteint des sujets jeunes 30-40 ans, qui ont un état vasculaire, artériel et veineux pratiquement toujours normal.

Le deuxième élément de la triade de Wirchow est la stase; bien que personne n'ait pu prouver l'effet thrombogénique d'un retard à l'écoulement du sang. Cette condition n'est pas non plus requise, en effet il s'agit de sujets jeunes en pleine activité, non alités.

./...

Un syndrome d'"hypercoagulabilité" représentait le troisième élément de cette triade, si ces sujets n'ont pas de trouble de la coagulation plasmatique, par contre, des anomalies de l'hémostase primaire nous ont semblé un élément important quant au rôle des plaquettes dans les mécanismes favorisant ces thrombophlébites récidivantes.

C'est ainsi que chez des malades nous avons trouvé une hyper-agrégabilité plaquettaire dont le support nous apparaît être la trop grande disponibilité des nucléotides agrégants, ainsi que l'augmentation de leur taux intraplaquettaire.

La maladie thromboembolique est, peut-être, en fait, l'expression clinique d'un ou plusieurs désordres biologiques favorisant la formation des trombi que nos méthodes actuelles de dépistage sont insuffisantes à révéler.

De ces investigations, et de la mise en évidence de désordres, responsables ou concomitant, , peut apparaître un moyen de dépistage précoce et de traitement préventif.

Dans cette perspective, l'investigation des divers éléments pouvant jouer un rôle dans la génèse des thrombophlébites nous paraît devoir être examinée systématiquement.

L'objet de cette thèse est d'explorer le troisème temps de l'hémostase, c'est-à-dire, le système fibrinolytique de ces malades, en essayant de mettre en évidence une diminution de son activation, comme certains auteurs ont essayé de le montrer par les biopsies veineuses et la méthode autographique de Todd chez des sujets ayant des antécédents de phlébothromboses (Pandolfi I.M., Nilsson (n° 43).

./...

Physiologie de la fibrinolyse

La fibrinolyse représente l'ensemble des processus physiologiques tendant à solubiliser la fibrine insoluble sous l'effet d'une enzyme spécifique : la plasmine formée à partir d'un précurseur inactif, le plasminogène sous l'effet de différents activateurs.

Le plasminogène (4)

Le plasminogène est une protéine présente dans le plasma, à la concentration de 100 à 200 microgrammes par millilitre de plasma.

Elle serait synthétisée par le foie. Elle est présente dans différents tissus, dans le liquide synovial, dans les polynucléaires neutrophiles et eosinophiles, mais ces derniers seraient très vraisemblablement un moyen de transport (89) .

Cette protéine migre avec les α_2 globulines, présente dans la fraction I de Cohn, intimement liée au fibrinogène, obtenue à l'état purifiée sur DEAE cellulose ou sephadex. De poids moléculaire : 89 000 de constante de sédimentation 20 S thermolabile, détruite à 56° C. Protéine dont la molécule est constituée d'une seule chaine polypeptidique, 22 ponts dissulfures réunissent les acides aminés de la molécule, une lysine représente l'extrémité N terminal et une asparagine l'extrémité C terminal.

```
                  s-----s                 s-----s
                  |   x |                 |   y |
NH2 ___ Lysine    |-----'Arg--------Val|-----|--ASPARAGINE----- COOH
                          |           |
                          s-----------s          x+y = 21      ./...
```

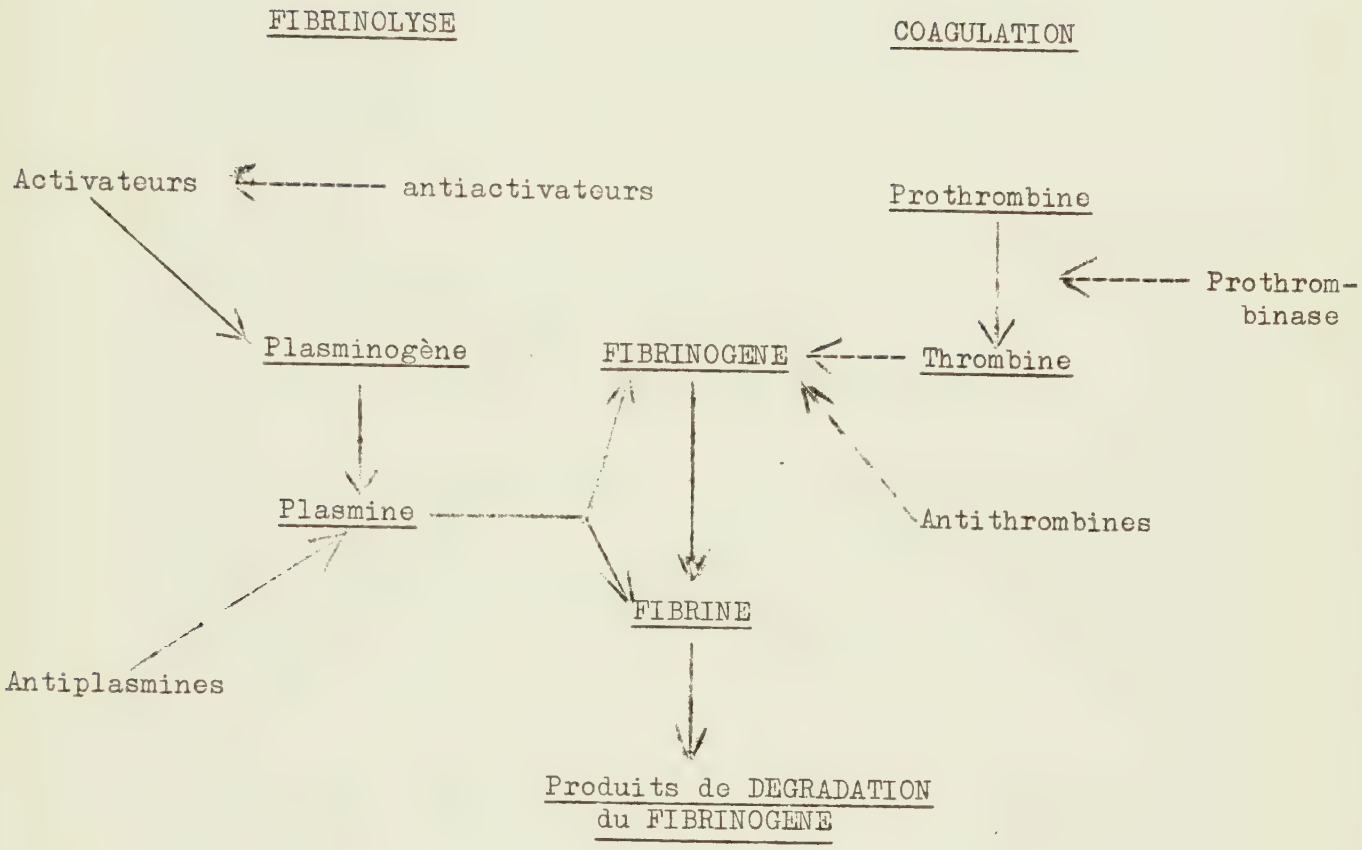

FIBRINOLYSE
COAGULATION
Activateurs
antiactivateurs
Prothrombine
Prothrom-
binase
Plasminogène
FIBRINOGENE
Thrombine
Plasmine
Antithrombines
FIBRINE
Antiplasmines
Produits de DEGRADATION
du FIBRINOGENE

TABLEAU I

Cette protéine circule dans le plasma à l'état inactif. Elle doit subir une modification de sa structure moléculaire, pour se transformer en une enzyme protéolytique : la plasmine. Cette modification est liée à l'action d'activateursqui sont d'origines multiples.

Les Activateurs du plasminogène

Parmi les activateurs physiologiques :
nous distinguons les activateurs tissulaires

Les activateurs tissulaires ont été localisés pour la première fois par TODD, par la méthode autographique, utilisant des coupes fines de parois vasculaires déposées sur une couche mince de fibrine. Cet activateur tissulaire est localisée au niveau de l'endothélium des veines, des capillaires et des seules artères pulmonaires.

La concentration en activateur tissulaire du plasminogène est différent suivant les organes : très importante dans l'utérus, la prostate, le poumon, faible dans le cerveau, la rate, le foie.

Au point de vue physico-chimique, il s'agit encore d'une protéine de poids moléculaire 50 000, thermolabile, détruite par chauffage à 56° C pendant une demi-heure, son optimum d'activité se situe à pH 8,5 - 9.

L'urokinase

Williams fut le premier à mettre en évidence un activateur du plasminogène dans les urines. Elle assure la dissolution des dépôts de fibrine situés dans l'arbre urinaire.

./...

Elle est secrétée par les cellules rénales. L'urokinase passe dans les urines, mais pas dans la circulation. On sait à l'heure actuelle qu'elle ne représente pas la cléarance rénale de l'activateur plasmatique: Kucinski et coll. ont pu démontrer la non identité immunologique de l'urokinase et de l'activateur tissulaire.

Au point de vue physico-chimique, il s'agit d'une protéine obtenue à l'état purifié et récemment à l'état cristallisé : de poids moléculaire 54 000, stable à 22° C. et 37 ° C selon une gamme étendue de pH.

C'est une enzyme protéolytique capable de cliver les lésions arginine-valine. Elle peut hydrolyser les esters d'arginine et de lysine, propriété qui est à la base d'une méthode de dosage permettant de définir l'urokinase en unités CTA (Committee on thrombolytic agents).

Quant à l'activateur plasmatique

Le fait que le sang coagulé, supposé prélevé en l'absence de tout contact avec l'activateur tissulaire, lyse en 48 ou 72 heures est un argument en faveur de son existence.

Son identité n'est pas confirmée, il pourrait s'agir de l'activateur tissulaire passé dans le courant sanguin, ceci n'est pas démontré. Il ne s'agit pas du cofacteur plasmatique de la streptokinase; certains pensent que le facteur XII (Hageman) pourrait être ce facteur, car la lyse des euglobulines des sujets ayant un déficit congénital en facteur XII se fait très lentement.

./...

Parmi les activateurs non physiologiques :

Les actvateurs d'origine bactériennes,
le plus important est la stréptokinase

La stréptokinase est extraite des cultures de stréptocoques hémolityques du groupe "C".

Elle se combine molécule à molécule avec le plasminogène humain, pour former un complexe, capable de transformer le plasminogène en plasmine. Elle peut se combiner également avec la plasmine, pour former un complexe activateur capable de transformer le plasminogène en plasmine. Ainsi que cours de la thrombolyse, un excès de stréptokinase n'entraîne pas de plasminémie circulante. Au contraire, de faibles doses de stréptokinase peuvent provoquer des états de fibrinolytiques non contrôlés.

La stréptokinase est directement active sur le plasminogène chez l'homme. Il n'en est pas de même dans les différentes espèces d'animaux, notamment chez le boeuf, où il est nécessaire d'ajouter à la stré[illegible] du sérum humain [illegible] qu'il se forme un activateur transformant le plasminogène [illegible]. Certains ont émis l'hypothèse qu'il existait un proactivateur du plasminogène présent dans le sérum humain. En fait, il semble que le cofacteur de la stréptokinase présent dans le sérum humain, n'est autre que le plasminogène humain.

La staphylokinase

I[illegible]lokinase est extraite de fitrats de cultures de staphylocoques et est un activateur peu puissant du plasminogène. Très peu employé en thérapeutique également inactive directement sur le plasminogène bovin.

./...

Parmi les activateurs non physiologiques en dehors des activateurs bactériens citons :

Le chloroforme, les dérivés du benzène, les acides gras, les solvants organiques.

Ils libèreraient le plasminogène d'un inhibiteur permettant son activation.

L'activité spontanée du plasminogène

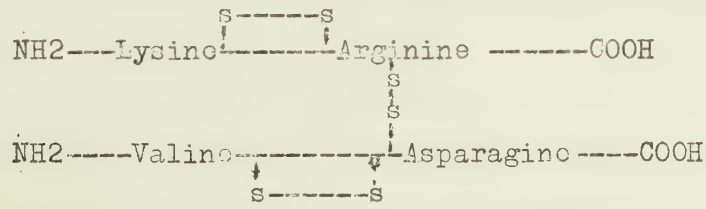
Le plasminogène purifié, préparé selon la méthode de Kline, peut se transformer autocatalytiquement, en plasmine à 20° C et pH 7,8. La trypsine et la plasmine semblent capables d'activer le plasminogène.

Le mécanisme d'action des activateurs, qu'il soit physiologique ou non physiologique, sur le plasminogène pour donner la plasmine est identique.

C'est par un réarrangement moléculaire, qu'apparaît l'activité plasminique.

Les activateurs clivent une liaison arginine-valine du plasminogène donnant naissance à une molécule formée de deux chaînes polypéptidiques, reliées entre elles par un pont disulfure.

Cette théorie explique que le plasminogène et la plasmine aient le même poids moléculaire : 88 000, la même composition en acides aminés, 22 ponts disulfures et une identité immunologique.



x+y=2I

./...

L'action de la plasmine sur son substrat

La plasmine est une puissante enzyme protéolytique, active à pH neutre. En clivant le pont disulfure reliant les deux chaînes polypéptidiques de la molécule on perd presque complètement l'activité enzymatique. Ce n'est pas le cas pour les 21 autres ponts disulfures reliant les différents acides aminés à l'intérieur des chaînes, la perte de l'activité de l'enzyme est alors proportionnelle au nombre de ponts disulfures clivés.

On peut obtenir la plasmine sous forme purifiée. La plasmine est une endopéptidase puissante, dont l'action n'est pas limitée à la fibrine mais s'étend au fibrinogène, à d'autres facteurs de la coagulation, les facteurs V (proaccélérine), VIII (antihémophilique A), au complexe protamine-héparine, à la caséine, à l'hémoglobine, à l'ACTH, etc...

L'action de la plasmine sur le fibrinogène et la fibrine entraînent la formation de produits de dégradation

Selon le temps d'action de la plasmine on distingue :
des produits intermédiaires

Les produits intermédiaires X et Y sont les premiers à apparaître au cours de la protéolyse du fibrinogène ou de la fibrine par la plasmine. Ils peuvent encore être attaqués par la plasmine.

Le produit X apparaît le premier, diffère peu du fibrinogène, contient encore 2 fibrinopéptides au lieu de 4. Son poids moléculaire est très sensiblement inférieur à celui du fibrinogène, il peut coaguler après action de la thrombine.

./...

Le produit Y apparaît ensuite, il ne contient plus de fibrinopéptide et n'est plus coagulable par la thrombine.

Ces 2 produits X et Y ont une action inhibitrice de la polymérisation des monomères de fibrine, ils s'accolent aux monomères pour former des complexes solubles, ils possèdent les 4 sites antigéniques du fibrinogène.

Les produits terminaux

Les produits terminaux apparaissent après 24 heures d'action de la plasmine sur le fibrinogène et la fibrine.

On trouve des polypéptides de faible poids moléculaire représentant 30 % des produits totaux. Ils sont solubles en acide trichloracétique et ne possèdent plus de déterminant antigénique commun avec le fibrinogène.

On trouve également 2 molécules de fragments D et E par molécule de fibrinogène, non solubles en acide trichloracétique; ils ont gardé chacun un des déterminants antigéniques du fibrinogène permettant de les mettre en évidence par immunoprécipitation, ou immunoélectrophorèse à l'aide d'immun-sérum anti-fibrinogène.

Le fragment D est thermolabile, a un point moléculaire de 88 000, il interfère sur la fibrinoformation en se fixant aux monomères de fibrine, libérés par action de la thrombine sur le fibrinogène, empêchant sa polymérisation.

./...

Le fragment E est thermostable, de poids moléculaire 35 000 à 50 000, il a une action antithrombine, il est inhibiteur de l'agrégation plaquettaire en présence d'ADP.

A côté des systèmes d'activation de la fibrinolyse, il existe des mécanismes inhibiteurs

On distingue deux sortes d'inhibiteurs :

1°) les inhibiteurs de l'activation du plasminogène

Les inhibiteurs physiologiques

Ils sont représentés essentiellement par la clearance hépatique des activateurs du plasminogène pour Mac Nicol, il existe un antiactivateur migrant entre α_1 et α_2 globulines.

Les inhibiteurs acquis

Les antistréptokinases sont des inhibiteurs acquis, soit au cours des infections à stréptocoques soit au cours d'un traitement par la stréptokinase. Leur taux doit être connu afin d'apprécier la dose initiale de stréptokinase à utiliser au cours des traitements thrombolytiques.

L'acide ε amino-caproïque, de poids moléculaire 131. Il a une structure chimique sensiblement identique à la lysine. Il semble empêcher de façon compétitive l'action de la stréptokinase, de l'urokinase et de l'activateur plasmatique sur le plasminogène. Son mode d'action est responsable des coliques néphrétiques survenant quelquefois après son emploi en thérapeutique

./...

2°) Les antiplasmines

Les antiplasmines pysiologiques

Le plasma et le sérum contiennent suffisamment d'antiplasmines pour neutraliser 10 fois la plasmine disponible de l'organisme.

Deux activités antiplasmines ont été décrites : l'une immédiate migrant dans les α_1 globulines, l'autre progressive migrant avec les α_2 globulines.

En fait, on reconnaît depuis peu qu'il existe surtout une α_1 globuline identique à α_1 antitrypsine, de poids moléculaire 47 000 qui possède à la fois les actions immédiates et progressives.

Quant à l'activité antiplasminique des plaquettes, on ne sait encore si elle est réellement plaquettaire, ou si c'est une activité plasmatique adsorbée sur la plaquette.

Les antiplasmines non physiologiques

Le plus anciennement connu est l'inhibiteur du soja, mais il est antigénique et antithrombique ce qui contre-indique son utilisation en thérapeutique.

L'antiplasmine le plus couramment employé en thérapeutique est l'inhibiteur de Kunitz ou pancréatique, c'est un polypéptide de poids moléculaire 9 000.

On peut aussi extraire des antiplasmines des parotides et des poumons de boeuf.

./...

Physiopathologie du système fibrinolytique

Le mécanisme déclenchant l'activation du système fibrinolytique est encore mal connu. On a cru pendant un certain temps que la fibrinolyse était la voie normale du catabolisme du fibrinogène, c'est-à-dire qu'il existait à l'état permanent une certaine activité fibrinolytique, permettant la dégradation du fibrinogène. Cette opinion a été controversée et il semble que l'activation du système fibrinolytique n'intervienne que dans des conditions pathologiques pour lyser les dépôts de fibrine. Il s'agit d'un phénomème très général dépassant le cadre de la perméabilité des uretéres, des alvéoles pulmonaires. Astrup suggère également la participation du système fibrinolytique dans le processus de cicatrisation.

Kwaan montra par les méthodes autographiques une intense activité fibrinolytique dans les capillaires néoformés pendant la cicatrisation (15).

Nous nous intéresserons plus particulièrement au rôle de la fibrinolyse dans le maintien de la perméabilité vasculaire.

Lors de la formation du thrombus in vivo, le plasminogène est inclus dans le caillot de fibrine ainsi que le facteur XIII ou facteur stabilisateur de la fibrine. Ces 2 éléments sont très immportants à considérer, car ils agissent en sens inverse sur la persistance et l'extension du thrombus. Il est en effet important, que le plasminogène soit, in situ, directement accessible à l'activateur tissulaire contenu dans la cellule endothéliale de la paroi veineuse. L'activation peut donc avoir lieu in situ. Par contre, le facteur XIII contribue à la solidité du caillot et à son insolubilisation, phénomène qui augmente au cours du temps.

./...

Il a été démontré que le facteur XIII, plus il était resté longtemps en contact avec la fibrine, plus l'action de la plasmine était lente. Mais le phénomène n'est pas aussi univoque, car on peut obtenir une activation du système fibrinolytique indépendamment de la formation d'un thrombus. C'est le cas de l'anoxie tissulaire qui nous intéresse tout particulièrement après occlusion veineuse momentanée chez le sujet normal. On induit une activité fibrinolytique décelable par les tests d'exploration de la fibrinolyse.

En dépit de nombreuses études, ce point n'est pas bien établi. Il semble certain que les surfaces mouillables activent simultanément la coagulation et la fibrinolyse et que le facteur XII (Hageman) soit indispensable pour ces deux processus (29-30).

On observe chez les sujets qui ont un déficit en facteur XII, non seulement un retard à la coagulation mais aussi un retard, parfois une absence, de la lyse des euglobulines. Cependant, les mécanismes d'action du facteur XII sur la fibrinolyse sont mal connus, puisque ce facteur à l'état purifié ne peut pas activer le plasminogène. Mais il semble que le facteur XII soit nécessaire pour le développement maximum de l'activité fibrinolytique induite par l'anoxie (30).

Le fait que l'on observe une augmentation de l'activité fibrinolytique après occlusion veineuse chez les déficitaires en facteur XII fait supposer que l'activateur d'origine tissulaire peut supplémenter l'activation d'origine plasmatique dont le facteur XII serait en partie responsable.

./...

Les enzymes fibrinolytiques cellulaires semblent jouer un rôle important dans la dissolution du caillot. Les leucocytes, les polynucléaires en particulier les éosinophiles, contiennent du plasminogène, des activateurs et des inhibiteurs (54).

Il existe également des activateurs plaquettaires, l'un intraplaquettaire et l'autre correspondant probablement à l'activateur plasmatique adsorbé à la surface plaquettaire (70).

Rôle des antiplasmines

Les antiplasmines permettent la non diffusion du processus de fibrinolyse locale. Elles sont très puissantes et peuvent neutraliser une très grande quantité de plasmine. Aussi, pour observer une fibrinolyse dans la circulation générale, faut-il une production très importante de plasmine.

HYPOTHESES ETIOLOGIQUES DES MALADIES THROMO-EMBOLIQUES

Le mécanisme étiologique des thromboses est depuis cent ans expliqué par la triade de Wirchow (111) faisant jouer à la stase, à la lesion de la paroi du vaisseau et à l'hpercoagulabilité sanguine un rôle promoteur (106). Si la triade de Wirchow se vérifie dans la survenue des phlébites ou embolies, ces éléments agissent de façon moins évidente au cours des maladies thrombo-emboliques : en effet, il s'agit de sujets jeunes, indemnes de toute lésion athéromateuse évidente ou d'autres anomalies de la paroi vasculaire visibles. Ce sont des sujets en pleine activité, donc le rôle de la stase ne semble pas intervenir, quant aux troubles de l'hémostase, nous allons voir plus loin ce que l'on peut en penser (80).

De nombreux auteurs ont émis de nouvelles hypothèses exposant des mécanismes différents, aucun n'étant totalement satisfaisant.

Parmi ces tentatives d'explications physio-pathologiques, nous avons retenu les suivantes; elles portent sur trois éléments principaux :

1) le rôle du vaisseau
   - Altération de la paroi vasculaire par une infection inapparente.

2) le rôle des plaquettes
   - Hyperagrégabilité plaquettaire et le rôle du magnésium.

./...

3) le rôle du système plasmatique de la coagulation et de la fibrinolyse

- Augmentation du facteur plaquettaire 4
- Déficit en antithrombine
- Déficit en activateur du plasminogène
- Excès d'inhibiteur dans le système fibrinolytique

Nous allons envisager plus en détail chacun de ces chapitres. Tout d'abord le rôle du vaisseau.

Le rôle du vaisseau

Depuis longtemps on a essayé de prouver le rôle étiologique de l'infection au cours des maladies thrombo-emboliques.

L'éventualité a été émise qu'une infection inapparente par un organisme rare ou de morphologie atypique et difficile à cultiver et à reconnaître, pouvait être responsable de nombreux cas d'accidents thrombo-emboliques récidivants.

Des études faites à l'université de Cincinnati(2) sur des cultures de sang ou de thrombi prélevés chirurgicalement chez 50 personnes ayant fait des accidents de thromboses, trouvèrent des bactéries atypiques et sous forme "L". In vitro, les cultures de ces formes "L" avaient une activité qui s'interférait avec l'héparine et à son action anticoagulante.

Gesner et Jenkins (25) rapportent la production d'héparinase par des bactéroïdes.

Il semblerait donc que l'on puisse décrire des maladies thrombo-embolique dues à des organismes interférant avec le mécanisde la coagulation, en créant des altérations des parois vasculaires pouvant induire des thromboses.

Rôle des plaquettes

Rôle des plaquettes dans l'hémostase

L'aptitude qu'ont les plaquettes à adhérer au vaisseau lésé est le premier phénomène nécessaire à l'arrêt d'un saignement, Poole et collaborateurs (82) ont pu montrer que les plaquettes adhéraient, in vivo, au cément sous-endothélial et à certains structures des fibres de collagène. Il n'existe pas d'adhésion des plaquettes au tissu élastique, ni aux cellules endothéliales.

Cette adhésion aux fibres de collagène est suivie d'une agrégation plaquettaire due à la libération d'ADP par les plaquettes. La présence de calcium et de magnésium est nécessaire à l'agrégation, mais en quantité très faible. Hovig (86) utilisant des plaquettes de lapin, a montré que le calcium et non le magnésium est nécessaire pour la libération de l'ADP et l'agrégation des plaquettes par l'ADP.

L'agrégation induite par l'ADP est spontanément reversible, Ce phénomène de désagrégation que l'on peut mesurer, in vitro, en présence de faibles concentrations d'ADP paraît lié à l'inactivation de l'ADP par un système enzymatique, plasmatique et plaquettaire où les adénylates kinases jouent un rôle essentiel (71).

L'agrégation initiale des plaquettes conduit à la formation d'un thrombus blanc qui recouvre la brèche, mais reste perméable; elle est suivie d'une agrégation irréversible avec métamorphose visqueuse des plaquettes conduisant à l'imperméabilisation du caillot. Cette métamorphose visqueuse des plaquettes correspond à un ensemble de modifications morphologiques des plaquettes, mais aussi à des modifications biochimiques avec libération d'un certain nombre de facteurs intervenant dans l'hémostase : la 5 hydroxytryptamine, l'adrénaline, l'histamine, certains facteurs de la coagulation, le facteur 3 plaquettaire et de lyse (59) des nucléotides et des enzymes, le facteur 4 plaquettaire.

./...

L'ensemble de ces phénomènes irréversibles conduit à la formation d'un clou hémostatique imperméable permettant l'arrêt du saignement. Ce clou hémostatique va être renforcé par la formation de fibrine résultant des phénomènes de coagulation plasmatique proprement dite.

Le rôle des plaquettes dans la thrombose

De nombreux auteurs (74) ont essayé d'induire une thrombose en utilisant quelquefois de l'ADP en comparaison avec des facteurs de coagulation. Nordov et Chandler (75) ont démontré que des doses plus importantes d'ADP doivent être données in vivo que celles qui sont utilisées in vitro pour entraîner la même agrégation plaquettaire; l'importance des facteurs de dégradation de l'ADP par les adénylatekinases plasmatiques et plaquettaires doit être considérée.

D'autres facteurs jouent également un rôle dans la thrombose plaquettaire :

- la sérotonine : en effet la suppression ou la diminution de la sérotonine plaquettaire par la réserpinechez le lapin entraîne des hémorragies (112).

- l'adrénaline peut avoir un rôle dans la thrombose in vivo, car certaines plaquettes sont naturellement plus résistantes si elles transportent de l'adrénaline ou de la noradrénaline (113).

- les phospholipides et les acides gras libres : Si la lécithine pure est incapable de provoquer l'agrégation plaquettaire, la sphingo myéline et la lysolecithine amènent une agrégation plaquettaire irréversible. Il faut se souvenir que les nucléotides adényliques sont capables de rendre le facteur plaquettaire 3 disponible (19).

./...

Des facteurs physiques, telle la viscosité du sang, augmentée dans les myélomes ou les macroglobulinémies, les forces électrochimiques, qui dépendent de l'anticoagulant utilisé (114) suggère qu'un processus de surface actif est responsable de l'induction d'une thrombose intra-vasculaire.

L'alimentation : Nordov et Chandler (54) ont montré que l'incidence des thromboses est augmentée chez les rats ayant des veines lésées lorsqu'ils sont soumis à une alimentation riche en acide gras saturés, du cholestérol et du thiouracil.

L'âge des plaquettes : Certains auteurs pensent que plus les plaquettes sont jeunes, plus elles sont adhésives.

Rôle du magnésium

Ces dernières années, des etudes portant sur le magnésium impliquèrent son action dans chacun des trois stades de hémostase.

Dans l'hémostase primaire, ou il agirait comme stabilisateur de la membrane plaquettaire inhibant ainsi l'agrégation plaquettaire.

Dans la coagulation plasmatique, ou il provoquerait une hypo-coagulabilité en agissant sur la prothrombine (II), sur l'accélérine (facteur V), sur la proconvertine (VII), sur le facteur anti-hémophilique B (IX), sur le facteur Hageman (XII). Mais en fait, on ne sait s'il s'agit d'une action anticoagulante spécifique du Magnésium ou d'une action compétitive entre les ions calcium et magnésium. Il est à remarquer que les thromboses les plus fréquentes sont celles du post-partum et post-opératoires; Circonstances où le déficit magnésique est fréquent.

./...

Durlach et Dupont (21-22) rapportent deux observations de maladies thromboemboliques, associées à des signes neurologiques du déficit en magnésium, l'hypomagnésémie étant confirmée biologiquement, l'étude des fonctions plaquettaires met en évidence une hyperagrégabilité. Aux médicaments anticoagulants fut associé la prise de magnésium et tout arrêt de la magnésothérapie suivi d'un accident thromboembolique.

Il semble donc que la prise de magnésium dans ce cas aurait un rôle préventif certain des récidives thromboliques, mais cela ne peut être qu'une thérapeutique d'appoint au traitement anticoagulant.

Au cours des maladies thromboemboliques, nous avons pu mettre en évidence une hyperagrégabilité plaquettaire sous l'influence des différents inducteurs : collagène, adrénaline, ADP, à 24° et sur plaquettes isolées de leur milieu plasmatique, mises en suspension en sérum physiologique EDTA et une augmentation de l'activité agrégante du sérum, ceci probablement dû à une augmentation de la libération et du contenu en nucléotides plaquettaires, la libération accrue en facteur 4 plaquettaire ou facteur anti-héparine nous paraît être un resultat.

Les médicaments actuellement employés comme anticoagulants, l'héparine et les antivitamines K, ne jouent que sur la phase plasmatique de la coagulation. Il est intéressant de mentionner le fait que l'héparine provoque même aux doses employées une hyperagrégabilité plaquettaire, elle ne devient active sur l'agrégation plaquettaire qu'à des doses trop importantes en utilisation clinique.

Le rôle du plasma

Nous avons étudié le rôle de l'altération inapparente de la paroi vasculaire par l'infection, le rôle des plaquettes; nous allons envisager le rôle des désordres plasmatiques comme facteurs étiologiques possibles de maladies thromboemboliques.

Tout d'abord, essayons de préciser le concept d'hypercoagulabilité. Invoqué depuis très longtemps, certains éléments reposent sur des bases très solides, d'autres ne maintiennent pas la critique.

En dépit de la croyance très largement répandue d'un état d'hypercoagulabilité chez l'homme, la preuve de son existence reste difficile à prouver. Le concept d'hypercoagulabilité repose sur un certain nombre de faits,

d'une part sur des faits expérimentaux chez l'animal

Wessler (60) montra que si du sérum était injecté dans la circulation générale d'un lapin, un caillot intravasculaire se formait dans une portion de la veine jugulaire qui avait été isolée de la circulation peu de temps après l'injection. Les agents provoquant la formation du caillot étaient donc dans le sérum. Ils donnèrent le nom à ce facteur " d'accélérateur de la thrombose du sérum", dépendant plus ou moins du taux des facteurs IX (antihémophilique B) XI (P T A) et XII (Hageman). Le facteur XI activé a un pouvoir indiscutable de provoquer un thrombus lors de la stase.

Ces expériences sur les animaux démontrent clairement qu'un état d'hypercoagulabilité pouvait réellement exister pendant une plus ou moins longue période, dans la circulation générale, provoquant une coagulation intravasculaire locale seulement dans les conditions de stase. La durée de cette hypercoagulabilité est très dépendante des inhibiteurs plasmatiques circulants.

./...

D'autre part chez l'homme

De nombreuses études ont été faites en comparant les résultats de sujets normaux et de sujets exposés à de grands risques de thrombose, employant le temps de coagulation sur sang total. Le temps de recalcification du plasma et le temps de Quick, les résultats ont été très divers.

Spittel et ses collaborateurs (78) avaient essayé de mettre en évidence une différence dans le test de génération de thromboplasmatine. Ils rapportent une activité de coagulation augmentée chez un important nombre de sujets ayant fait des épisodes thromboemboliques et ils ont postulé qu'un facteur plasmatique spécial "l'accélérateur de la génération de thromboplastine" était responsable de cet effet. L'augmentation de la résistance à l'héparine semble se voir très fréquemment dans ces cas. L'interprétation de ces résultats est très incertaine, car les tests utilisés dans ces études sont très globaux rendant les résultats difficiles à interpréter.

Il est intéressant de remarquer que l'augmentation de la résistance à l'héparine, qui fait appel à un test très général de la coagulation, correspond à un fait très précis qui est l'augmentation de la libération du facteur 4 plaquettaire ou facteur anti héparinique. De nombreux chercheurs avaient rapporté des syndromes d'hyperactivité en rapport avec l'augmentation du taux des facteurs de la coagulation.

Alexander et ses collaborateurs (72) ont montré que le taux du facteur VIII (anti hémophylique A) était augmenté pendant la dernière période de grossesse.

Poller (75) montra que le taux du facteur VII était élevé chez plusieurs sujets qui avaient fait un accident thromboembolique récent, etc ....

./...

A l'heure actuelle il est établi que l'étape initiale de la formation des thrombi est indépendante de la coagulation plasmatique et dépend des fonctions plaquettaires et de facteurs autres que ceux impliqués dans la coagulation.

Bien que les états "d'hypercoagulabilité" favorisent le développement des thromboses, le corollaire, c'est-à-dire que l'hypercoagulabilité seule peut initier la thrombose n'est pas vrai.

Il peut exister en dehors d'un état d'hypercoagulabilité d'autres désordres pouvant être responsables ou contribuer à la formation de thromboses. Il peut s'agir d'un déficit en antithrombine ou d'une anomalie dans le système fibrinolytique soit par des inhibiteurs, soit par diminution en activateurs du plasminogène.

Déficit en antithrombine

Un désordre plasmatique pouvant être impliqué dans la génèse des thromboses récidivants, consistant en un déficit en antithrombine, a été rapporté pour la première fois par Von Kaulha (35).

Les antithrombines sont des inhibiteurs physiologiques intervenant dans la dernière phase de l'hémostase. Les antithrombines sont au nombre de six, les trois premières seules sont des inhibiteurs physiologiques. L'antithrombine I est en réalité le fibrinogène, une quantité importante de thrombine est absorbée dans le réseau fibrillaire lors de la transformation du fibrinogène en fibrine. L'antithrombine II est le cofacteur de l'héparine. L'antithrombine III, ou antithrombine progressive, est présente dans le plasma et le sérum, c'est une α_2 macroglobuline (5).

./...

Von Kaulha rapporta le cas d'une famille où la haute incidence des accidents thrombotiques survenant chez plusieurs de ces membres depuis l'âge de 15-20 ans pouvait être due à une défiscience héréditaire en antithrombine III.

Désordres dans le système fibrinolytique

La dissolution physiologique des thrombi nécessite un système fibrinolytique normal. Certains auteurs ont essayé de découvrir des anomalies du système fibrinolytique.

Les travaux de Nilsson et Pandolfi (43) portant sur l'activateur du plasminogène localisé au niveau des parois des veines des des membres supérieurs, inférieurs et des veines thrombosées, à l'aide de la méthode autographique de Todd et de biopsies veineuses, avant et après une épreuve d'anoxie tissulaire, mirent en évidence l'existence d'une activité fibrinolytique plus importante au niveau des veines des bras que des jambes, ce fait pouvant expliquer la fréquence très faible des phlébites des membres supérieurs :

- que l'activateur tissulaire du plasminogène était pratiquement absent des parois des veines thrombosées,
- et qu'après anoxie une très faible augmentation de l'activité fibrinolytique était notée dans le groupe de sujets ayant des antécédents de phlébothromboses par rapport au groupe de sujets témoins.

Un autre mécanisme, probablement très rare, a été rapporté par Nilsson et collaborateurs (44-45) comme cause éventuelle des thromboses récidivantes.

./...

Il s'agit du cas de deux jumeaux qui présentaient tous deux, depuis l'âge de 7-10 ans, des phlébites récidivantes et chez lesquels on mit en évidence une augmentation significative d'un inhibiteur de l'activation sur plasminogène et de l'urokinase.

Il semble donc possible d'établir une corrélation entre les anomalies du système fibrinolytique et l'apparition des thrombo-phlébites et admettre qu'un état Hypofibrinolytique peut être un facteur étiologique des maladies thromboemboliques.

M a t é r i e l

Témoins

Nous avons choisi nos 8 témoins parmi les personnes de notre laboratoire : 6 femmes et 4 hommes âgés de 22 à 32 ans, apparemment sains, bien portants, sans antécédents pathologiques.

Nous avons également exploré 3 sujets venus à la consultation qui avaient des antécédents de thromboses veineuses.

- M. Bel ... âgé de 69 ans, ayant des antécédents veineux, sous formes de varices depuis l'âge de 20 ans, chirurgicalement traité en 1960. A l'âge de 59 ans il fait une première embolie pulmonaire. En 1965, deuxième embolie pulmonaire après cure chirurgicale d'une hernie inguinale. Depuis cette date, il est sous traitement anticoagulant par les antivitamines K.

  En Octobre 1969, brusquement sans que l'on puisse trouver une cause déclenchante il fait une phlébite de la jambe gauche, suivie d'une embolie pulmonaire. L'étude de l'hémostase, alors qu'il prenait 3/4 de comprimé de phényl Indian Dione, donnaient les résultats suivants :

  Les agrégations plaquettaires à 24° C, après action du collagène, de l'adrénaline, de l'ADP, la consommation d'ADP, l'activité agrégante du sérum étaient normales. (tableau n° 2)

./...

- M. Trill ... 67 ans, est suivi dans le service pour leucose lymphoïde chronique depuis Mars 1968. Il est porteur d'une hernie hiatale et d'un ulcère duodénal connu depuis 10 ans.

  En Juillet et en Octobre 1967 il fait 2 phlébites de la jambe gauche. En Février 68, troisième phlébite. Depuis, il est soumis au traitement anticoagulant par la phényl Indian Dione. Quatrième phlébite du mollet gauche en Mars 1968, lors d'une hospitalisation.

- Mme UPM ... 35 ans, sans antécédent pathologique notable. Elle a eu deux grossesses menées à terme sans complication, nous est adressée en Février 70 pour une phlébite survenue après 2 mois de prise de médicament anticonceptionnel. L'étude de son hémostase est normale en dehors d'une thrombopénie modérée à 110 000. Le temps de Quick est à 75 %, le fibrinogène à 2,6 gr./l, les épreuves d'agrégations plaquettaires à 24° C sous l'action des différents inducteurs, collagène, adrénaline, et ADP, sont strictement normales ainsi que l'activité agrégante du sérum.

- M. DEG ... 58 ans, est hospitalisé en Avril 70 pour une tumeur cérébrale très rapidement extensible, chez un homme porteur d'un cancer du poumon. Il n'avait aucun antécédent pathologique, en particulier hémoragique. Le bilan de l'hémostase révèle un temps de coagulation supérieur à 30 mn, temps céphaline, kaolin, à 220 s. Le temps de Quick est à 100 %, les deux âges différentiels des facteurs II - V - VII - X - VIII - IX - XI sont sensiblement à 100 %. Le facteur XII - (Hageman) est à 1 %. La recherche anticoagulant circulant est négative. Le fibrinogène est à 6 gr.

./...

Deux cas de maladie thromboembolique

- M. MAG ... 38 ans, originaire de Turquie, est admis dans le Service en Octobre 1969 pour phlébites à répétition et embolie pulmonaire. Toute l'histoire débute en Juillet 1969, date à laquelle apparaissent des douleurs des deux membres inférieurs mises sur le compte d'un pincement discal pour lesquelles il reçoit des antalgiques dont la nature n'est pas précisée par les médecins turcs et une histoire pulmonaire traitée par antibiothérapie (Pénicilline), mais qui a postériori semble avoir été une embolie pulmonaire survenue alors que le malade n'était pas alité. En Août 1969 il fait une hématurie isolée. En Septembre il fait une phlébite du membre inférieur gauche puis du droit, mis au traitement par l'héparine de façon continue. En Octobre 1969, il est hospitalisé dans le service, à l'examen clinique on note une circulation veineuse collatérale abdominale. Alors que le traitement anticoagulant par les antivitamines K maintient le temps de Quick dans la zone d'efficacité thérapeutique, les phlébites se succèdent. Les examens paracliniques révèlent une activité de l'antithrombine normale, mais les études des agrégations plaquettaires (tableau n°3) mettent en évidence une hyperaggrégabilité à l'ADP, à l'adrénaline, surtout aux faibles doses, à 24° C ainsi que des plaquettes isolées du milieu plasmatique en suspension dans un sérum physiologique EDTA. Après une augmentation du taux d'adénosine disphosphate (ADP) libérée spontanément à 4° C et à 24° C en eau distillée. Une augmentation de l'activité agrégante du sérum après action de la thrombine.

La Cavographie authentifie une thrombose de la veine cave inférieure et des veines iliaques. Toutes les autres investigations à la recherche d'une maladie favorisant les thromboses : infection, cancer profond, collagénose, hernie hiatale ont été négatives.

./...

- Mme BEAU ... 35 ans, est suivie dans le service pour accidents thromboemboliques récidivants. L'histoire débute en Octobre 1965 par une phlébite pelvienne survenue au 9ème jour de son 4° accouchement qui s'était déroulé normalement après une grossesse normale menée à terme.

Au cours de l'année 1966 elle fait trois embolies pulmonaires. En 1967 apparition de douleurs abdominales, on pense le diagnostic de thrombose de la veine splénique. En Décembre 1967, elle fait une nouvelle phlébite pelvienne et en Janvier 1968 une phlébite de la jambe gauche.

La malade est depuis 1966 sous traitement anticoagulant continu par les antivitamines K, des dérivés des dicoumarol. Il existe une difficulté extrême à l'équilibration de ce traitement.

Une phlébographie en 1966 visualise une thrombose de la veine cave inférieure et des veines iliaques. En 1966, les études de ses fonctions plaquettaires à 24° C montrent une hyperagrégabilité sous l'influence des différents inducteurs : collagène, adrénaline, et une augmentation de l'activité agrégante du sérum après action de la thrombine.

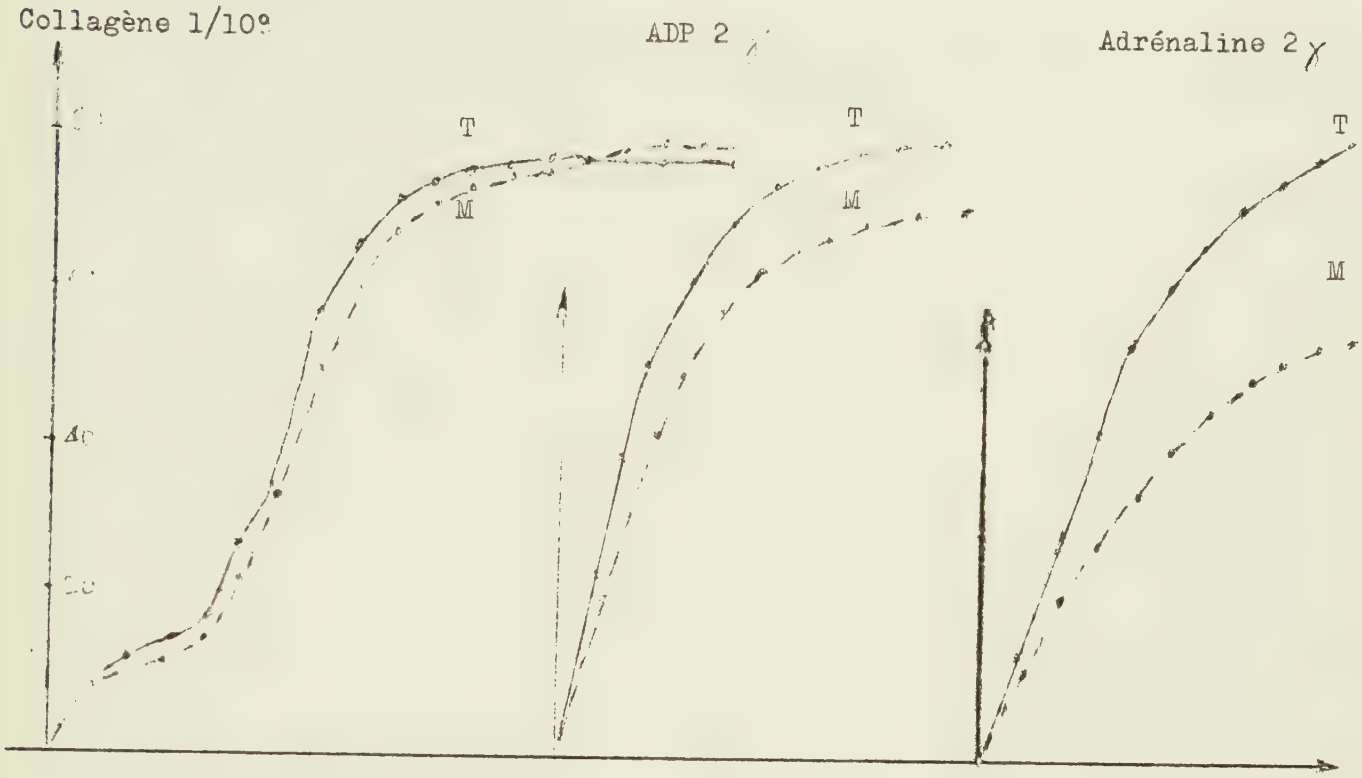
En 1970, le temps de QUICK est de 51 %, le V à 69 %, le II à 40 %, le VII et le X à 35 %. Le fibrinogène à 2,8 gr/l.

Les études des agrégations plaquettaires sont identiques à celles de 1966. On note encore une hyperagrégabilité à 24° C et à 37° C sous l'influence de différents inducteurs : collagène, adrénaline et ADP, ainsi qu'une hyperagrégabilité des plaquettes isolées du milieu plasmatique en suspension dans un liquide physiologique EDTA. On trouve une augmentation de l'activité agrégante du sérum après action de la thrombine et une augmentation de la libération spontanée de l'ADP ainsi qu'après incubation avec du kaolin (tableau n°4).

./...

Monsieur BEL ...

Agrégations plaquettaires à 24° à 250 000 plaquettes par millimètre cube



AAS

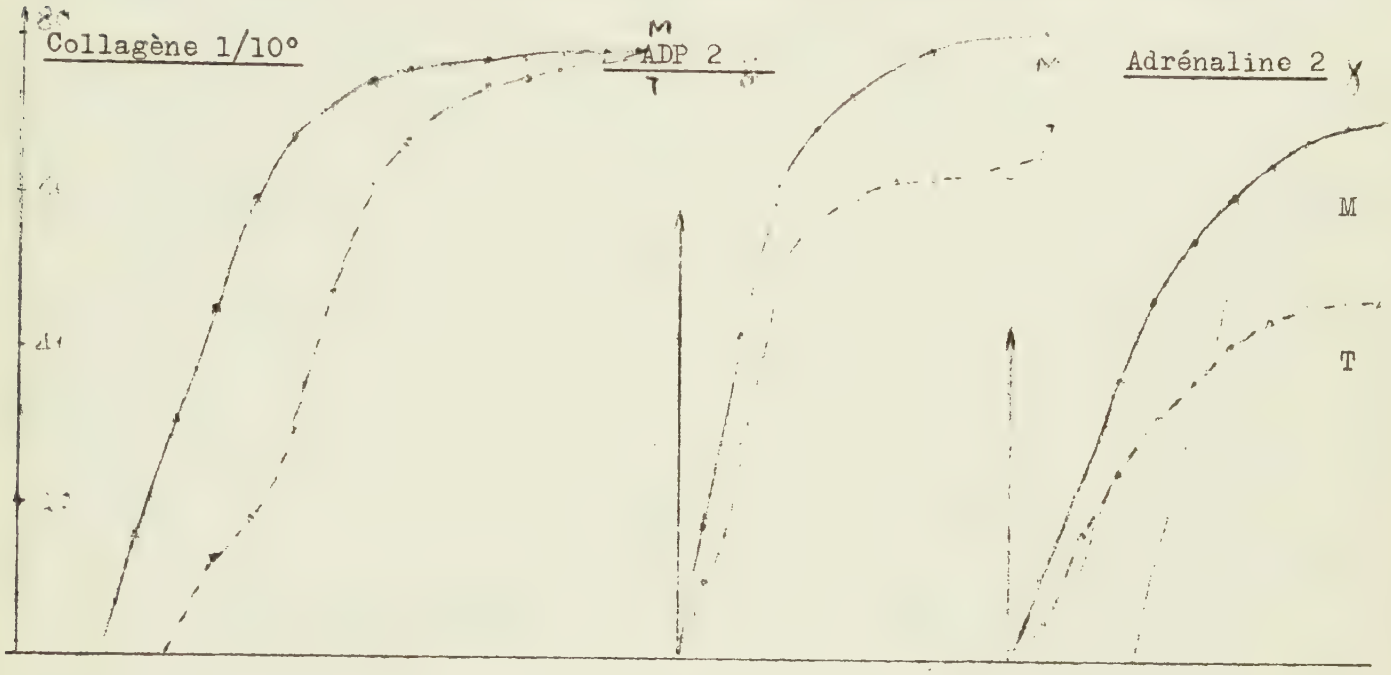
Consommation ADP

Témoin 50 % # 50 % Malade

TABLEAU N° 2

Monsieur MAC ...

Agrégations plaquettaires à 24° à 250 000 plaquettes par millimètre cube

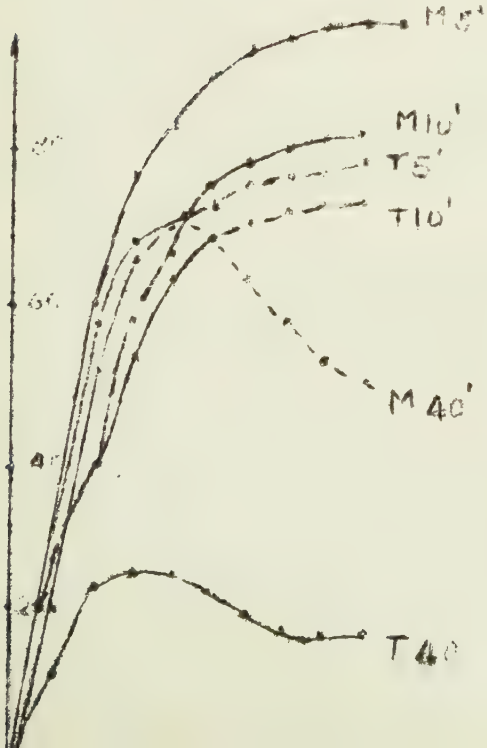


A AS

Consommation A D P

Témoin 50 % 50 % Malade

Plaquettes lavées

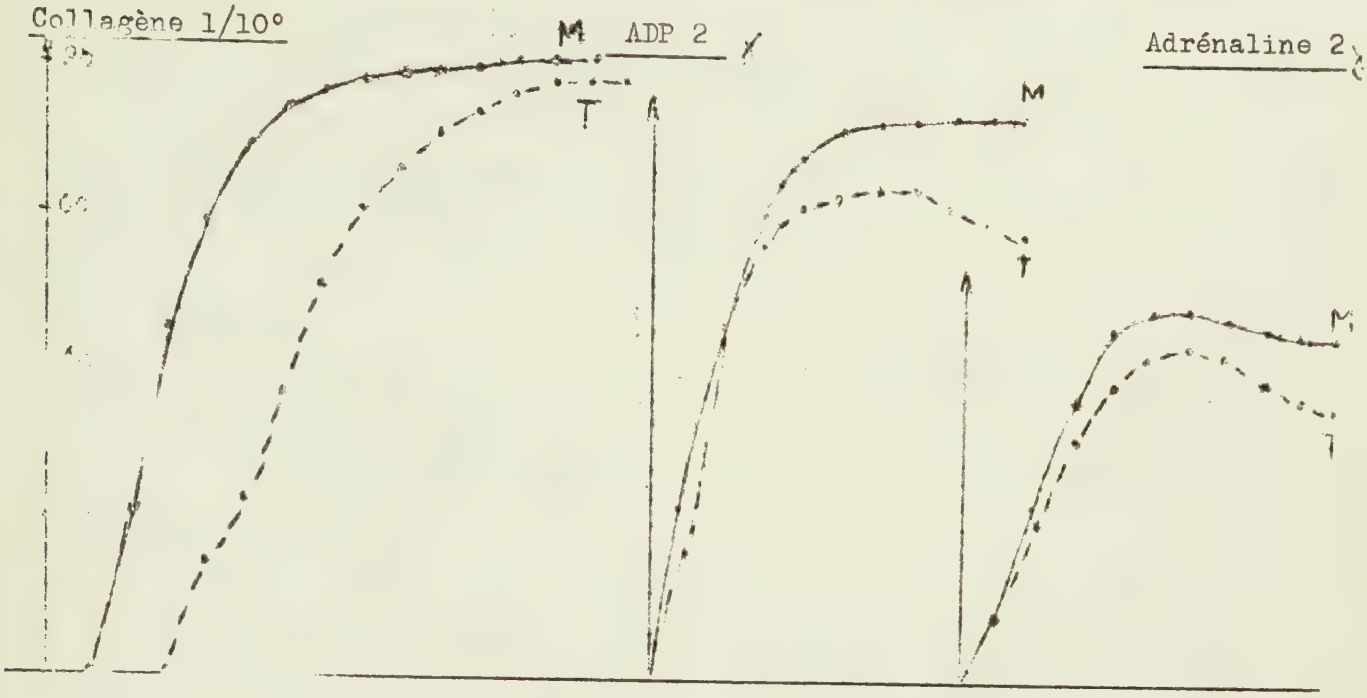


	Mg ++ +Fibrin.	Mg ++ +Fib. + ADP (2,5 /ml)	Mg ++ +Fib. +Adrénaline (1,25 /ml)
Malade	43	61	57
Témoin moyen	29	44	41

TABLEAU N°3

Mme BEA ...

Agrégations plaquettaires à 24° à 300 000 plaquettes par millimètre cube

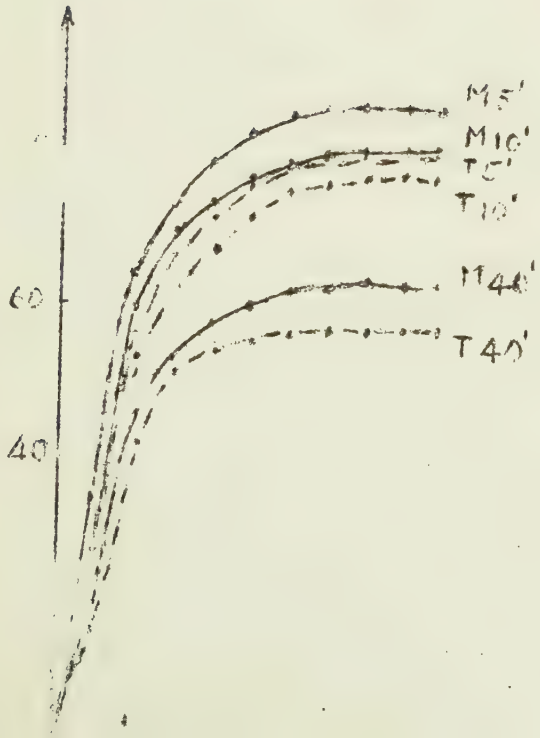


Activité Agrégante du Sérum

Consommation A D P

Témoin 50 % 50 % Malade

Plaquettes lavées



	Mg ++ +Fibrin.	Mg ++ +Fibr. + ADP	Mg ++ + Fib. +Adrénaline
Malade	33	(2,5/ ml) 55,5	(1,5/ ml 34
Témoin	26	44	25 -

TABLEAU N° 4

M é t h o d e s

Dosage du fibrinogène (66)

par la méthode pondérale décrite par GRAM H.C.

Principe

Transformation du fibrinogène en fibrine par une solution de thrombine calcique.

Séparation du coagulum et détermination du poids de fibrine après séchage.

- dans un tube à essai mettre 3 cc. de plasma du témoin ou du malade, recueilli sur citrate de sodium à 3,8 % (à raison de 1 volume pour 9 volumes) de sang, centrifuger pendant 15 minutes à 3 600 tours/mn.

- ajouter 10 cc. de tampon véronal Michaelis - pH 7,35, puis 2 cc. d'une solution de thrombine (Roche) à 20 unités Mellanby par ml de tampon Michaelis et 3 cc. de chlorure de calcium M/40.

- agiter - placer le tube 15 à 30 minutes au bain-marie à 37°
- relever le coagulum à l'aide d'une pipette pasteur, le mettre dans une capsule, le sécher à l'étuve pendant 1 heure à une température de 80° C.

La teneur du plasma en fibrinogène est déterminée à la balance de précision à l'aide de la formule suivante :

Si p est le poids du coagulum en mg.

$$P_{g/l} = \frac{p \times 1\,000}{3}$$

./...

Lyse des euglobines plasmatiques (42)

Selon la méthode décrite par Milstone J.H. (les inhibiteurs plasmatiques de la lyse sont éliminés par précipitation des euglobulines par acide acétique). Il est très important que cet examen soit pratiqué dans l'heure qui suit le prélèvement.

- prendre 0,5 ml de plasma provenant de sang recueilli sur citrate de sodium à 3,8 %, à raison d'un volume d'anticoagulant pour 9 volumes de sang - centrifuger à 3 600 tours/mn pendant 15 minutes.
- ajouter lentement et à froid 9,5 ml d'une solution d'acide acétique obtenue par dilution au $\frac{1}{100^{\circ}}$ d'une solution mère à 1,6 %, mélanger par retournement. Laisser 15 minutes au réfrigérateur à 4° C.
- répartir les 10 ml de solution dans deux tubes à hémolyse, centrifuger 10 minutes à 3 500 tours/mn, décanter le liquide surnageant, laisser sécher.
- ajouter dans chacun des 2 tubes 0,25 ml de tampon borate pH 7,6 fait de la façon suivante :

- Acide borique	:	11,25 gr.
- Borate de sodium	:	4 gr.
- Chlorure de sodium	:	2,25 gr.
- Eau distillée	:	1 000 ml.

qui dissout le précipité à l'aide d'un agitateur en verre.

On s'assure de la remise en suspension totale des euglobulines.

- ajouter 0,25 ml d'une solution calcique $\left(\frac{M}{40}\right)$
- mettre au bain-marie à 37°C, vérifier la coagulation des euglobulines.
- déclencher un chronomètre, puis surveiller leur dissolution à intervalles réguliers afin de déterminer le temps de lyse complet du caillot.

./...

Méthodes des plaques de fibrine (6)

Méthode semi-quantitative de l'activité fibrinolytique d'une solution d'euglobulines. Le gel de fibrine est constitué de fibrinogène bovin qui est insensible à l'action de la streptokinase, mais sensible à la présence d'activateur ou de plasmine. La destruction préalable du plasminogène lié au fibrinogène bovin par le chauffage rend les plaques uniquement sensibles à l'action de la plasmine.

Technique

Préparer une solution de fibrinogène bovin à raison de 6 gr. pour mille dissous en tampon phosphate de pH 7,4 mise à 37° C. jusqu'au moment de l'emploi (fibrinogène bovin Armour Industrie Biologique Française - Gennevilliers 92).

Couler au fond d'une boîte de Pétri à fond plat de 10 centimètres de diamètre 7 ml de la solution de fibrinogène. Ajouter 0,2 ml d'une solution de thrombine (Roche) à 20 unités Mellansky par millimètre de tampon phosphate de pH 7,4. Mélanger aussitôt en tournant lentement sur un fond stable pour obtenir un gel uniforme, laisser reposer 20 minutes à la température de la pièce.

Les plaques chauffées sont préparées de la même façon que les plaques standard, mais elles sont placées pendant 45 mn dans une étuve à une température de 60°. Laisser reposer 15 mn avant l'emploi.

Diviser la boite de Petri en 4 cadrans, on dépose dans chacun 0,03 ml de la substance à tester.

./...

Mesure de plasminogène par le test de sa résistance à la streptokinase

Selon la méthode décrite par Blix (8), le plasma de boeuf est insensible à l'action de la streptokinase. Dans ce test, il est employé comme source de fibrinogène, l'activité lytique n'est donc dépendante que du taux de plasminogène apporté par le plasma humain.

Pour le transformer en plasmine par la streptokinase :

- dans un bain de glace, préparer une série de tubes à hémolyse contenant 0,1 ml de plasma de boeuf prélevé sur mélange Wintrobe à raison de : 1 volume d'anticoagulant pour 9 volumes de sang centrifugé à 3 600 tours par minute pendant 30 minutes, puis absorbé deux fois sur sulfate de $BaSO_4$ à raison de 100 mg par millilitre de plasma et conservé congelé par petites fractions, servant comme source de fibrinogène.

- ajouter 0,05 ml de plasma citrate témoin ou à tester à différentes dilutions 1/10 - 1/20 - 1/40 et 1/80 en tampon phosphate de pH 7,4, puis 0,05 ml de solution de streptokinase (fibrinase Choay) solution à 10 000 unités par millilitre en tampon phosphate pH 7,4, déclencher le chronomètre. Agiter, porter les tubes au bain-marie à 37° C.

- vérifier la coagulation et surveiller la dissolution du caillot.

- noter les différents temps de lyse à l'aide d'une droite tracée sur papier millimétré en portant en ordonnée les temps de lyse en minutes, en abscisse les différentes dilutions du plasma témoin. Le 1/10° est pris arbitrairement comme 100 %; on peut exprimer en pourcentage la teneur en pro-activateur du plasma à tester.

./...

Dosages des produits de dégradation du fibrinogène selon la méthode décrite par Merskey (41)

Méthode basée sur le principe d'inhibition de l'hémaglutination d'hématies tannées.

Préparation de globules rouges

I - Sang O Rhésus positif prélevé sur ACD, formule A, à raison de 20 ml de sang pour 2 ml d'ACD. Laisser deux jours au frigidaire à + 4° C pour sensibiliser la méthode.

Décanter le plasma sans centrifuger, ajouter alors au culot globulaire (12 ml) 20 volumes de tampon phosphate Salin pH 6,4 (240 ml).

Tampon phosphate Salin pH 6,4

A/ - Phosphate de sodium disodique 0,15 Molaire 350 cm^3
- Phosphate de potassium mono-basique 0,15 Molaire 650 m3

B/ - Chlorure de sodium 0,15 Molaire : 1 000 cm3
- Laver trois fois de cette manière en centrifugeant chaque fois pendant 5 minutes à 2 500 gr.

II - Préparer extemporanément une solution d'acide tannique à 10 mg par millilitre en eau distillée, diluée au 1/400° en tampon phosphate Salin. Mélanger à volume égal la solution d'acide tannique et la suspension de globules rouges à 2 %, incuber 20 mn à la température de la pièce en mélangeant de temps en temps :

- 1 goutte de globules rouges tannés
- attendre 15 minutes

./...

- Laver 3 fois dans 20 fois le volume de tampon phosphate citrate pH 6,4.

  - Mélange de phosphate (A) 0,15 Molaire 1 litre
  - Citrate de sodium 0,1 Molaire 1 litre

- Faire une hématocrite. Amener la suspension à 4 % en tampon phosphate citrate.

III - Mélanger à volume égal 3/4 de la suspension de cellule à 4 % avec du plasma normal dilué à 1/250° en tampon phosphate citrate et 1/4 avec du sérum normal au 1/250°, laisser une heure à 37° en mélangeant de temps en temps.

- Laver 3 fois dans 20 fois le volume initial en tampon phosphate citrate pH 6,4.
- Faire une hématocrite. Amener la suspension à 4 %.

IV - Les globules rouges sont conservés à 4 % en tampon phosphate citrate contenant 0,02 % de sérum albumine humaine. Avant l'emploi laver une fois et reprendre les globules rouges en tampon phosphate citrate pH 6,4.

<u>Etalonnage des globules rouges tannés</u>

Dans chaque case des plaques, mettre :

- 0,1 ml de tampon phosphate citrate
- 0,1 ml de dilutions successives d'antifibrinogène diluée au 1/200° (obtenu dans notre laboratoire par immunisation à l'aide de fibrinogène Kabi chez le lapin).

./...

Comme solution finale d'anti fibrinogène, prendre la dilution correspondant à la 2ème après la franche positivité.

Plasma témoin

dont le taux de fibrinogène est déterminé au préalable par pesée, provenant de sang.

- Prélever sur citrate de sodium à 3,8 % à raison d'un volume d'anticoagulant pour 9 volumes de sang et 0,1 ml d'Iniprol pour 10 ml de sang.

- Centrifuger à haute vitesse pendant 15 mn et conserver en petites fractions à - 10° C.

Le Sérum du malade

- Prélever sur Iniprol à raison de 1/10 de ml pour 3 ml de sang, laisser 3 heures au bain-marie à 37°, centrifuger à haute vitesse 5 mn, décanter le sérum, le congeler.

- Dans chaque cas de la plaque, mettre 0,1 ml de tampon phosphate citrate.

  - dans la première case de la 1ère rangée : 0,1 ml de plasma, dont le taux de fibrinogène est comme au 1/100° et faire des dilutions successives.

  - dans la deuxième case de la 2ème rangée : ajouter 0,1 ml de sérum servant de contrôle et faire les dilutions successives.

  - dans la troisième rangée : 0,1 ml du sérum malade à tester, et faire des dilutions successives.

./...

- Puis ajouter dans chaque case 0,1 ml d'antifibrinogène à la dilution choisie auparavant.

- Préparer les globules rouges tannés en les lavant une fois en tampon phosphate citrate.

- Après une 1/2 heure, mettre 1 goutte de globules rouges dans chaque case, agiter, laisser 30 mn = 20° C.

- Relever la dilution où l'on obtient en dernier une agglutination.

- Le taux des PDF est exprimé en mg/100 ml.

Modalités de la réalisation de l'anoxie tissulaire

- Un brassard à tension type Vaquez est placé pendant 8 mn au bras à une tension égale à la demi-somme de la pression diastolique et systolique du sujet (3).

Les Prélèvements de sang

Chaque échantillon comprend :

1° - 9 ml de sang recueillis sur 1 ml de citrate de sodium à 3,8 % servant à la détermination du taux de fibrinogène, à l'évaluation de l'activité lytique, une partie étant conservée congelée pour le dosage du plasminogène.

2° - 3 ml de sang prélevés sur 1/10 de ml d'Iniprol, placés 3 heures au bain-marie à 37°, centrifugés à 2500 tours pendant 5 minutes, décantés.

Conserver le sérum au congélateur pour la détermination des produits de dégradation du fibrinogène.

./...

Le 1er prélèvement est effectué

avant toute épreuve

Le 2ème prélèvement

est pratiqué au terme des 8 mn d'occlusion veineuse, mais au bras opposé permettant de faire la part de l'augmentation de l'activité fibrinolytique due au Stress.

Le 3ème prélèvement

est effectué au bras au terme des 8 minutes d'anoxie tissulaire.

Résultats

I - Le temps de lyse des euglobulines

- avant toute épreuve d'anoxie tissulaire

Nous avons trouvé des temps de lyse des euglobulines supérieurs à 3 h. chez tous les sujets explorés.

- après l'épreuve d'anoxie tissulaire au bras controlatéral

Nous avons remarqué qu'une faible variation du temps de lyse des euglobulines, cette augmentation de l'activité fibrinolytique représente la part due au Stress.

- nous avons trouvé comme temps de lyse des euglobulines

1° - Parmi les temoins

Pour 7 témoins sur 8, nous avons obtenu une nette diminution du temps de lyse des euglobulines, régulièrement trouvé entre 1 h. et 1 h 45'.

2° - Pour un seul témoin sur 8 - M. BOU ... nous n'avons obtenu aucune variation après l'épreuve d'anoxie : les euglobulines ont lysé en plus de 3 h.

3° -Parmi les personnes ayant fait des phlébothromboses

Nous avons trouvé :

- Pour Mme UPM et M. THI ... un raccourcissement du temps de lyse des euglobulines de 4 h, avant toute épreuve, à 1 h.45' après l'anoxie tissulaire.

./...

- Pour M. BEL ... pratiquement aucune variation, la lyse de ses euglobulines s'est faite en 3 h., après l'épreuve d'anoxie tissulaire.

4° - Quant à nos deux malades atteints de maladie thromboembolique

Mme BEAU ... que nous avons exploré à deux reprises, à 15 jours d'intervalle, a lysé ses euglobulines avant comme après l'anoxie tissulaire, en 3 h.30'.

Nous avons obtenu des résultats identiques pour M. MAC ... que nous avons également exploré 2 fois; cependant nous donnons les résultats de la 2ème épreuve sous réserve, ayant été obligés d'arrêter l'occlusion veineuse précocement au bout de 4'. Son temps de lyse des euglobulines était de 5 h.30' avant, ainsi qu'après l'anoxie tissulaire.

M. DEG... ,qui a un déficit en facteur XII (Hageman) et un cancer au poumon, a lysé ses euglobulines avant anoxie en 3 h.30' et en 45' après réalisation de l'anoxie.

II - Résultats de l'activité fibrinolytique obtenus par les plaques de fibrine

Les surfaces de lyse sont obtenues en multipliant les deux diamètres perpendiculaires et sont exprimés en mm2.

Par les plaques de fibrine standard

Nous avons obtenu une corrélation parfaite entre le raccourcissement des temps de lyse des euglobulines et l'augmentation des surfaces de lyse.

./...

Chez 7 témoins sur 8

- Les surfaces de lyse qui variaient de 20 à 30 mm2 avant toute épreuve augmentaient régulièrement à des chiffres compris entre 80 et 110 mm2.
- Pour 1 seul témoin M. BOU ... nous n'avons noté aucune variation dans la surface de lyse.

Parmi les malades aux antécédents de phlébo-thromboses :

- Chez Mme UPE et M. THIL ..., les surfaces de lyse sur les plaques de fibrine standard ont augmenté de 20 à 80 ou 100 mm2 après anoxie tissulaire.
- Seul pour M. BEL ... nous n'avons eu aucune variation.
- Quant à nos deux cas de maladies thromboemboliques

  Nous n'avons jamais observé d'augmentation dans les surfaces de lyse après anoxie.
- Chez M. DEG ... (déficit en facteur XII Hageman) nous avons observé une nette augmentation des surfaces de lyse après anoxie tissulaire.

Résultats des surfaces de lyse obtenues sur les plaques de fibrine chauffées

- Nous avons obtenu une légère augmentation à 40-50 mm2 des surfaces de lyse sur les plaques de fibrine chauffées, après anoxie tissulaire, uniquement chez les sujets chez lesquels nous avions obtenu une augmentation nette de la surface de lyse entre 80 et 100 mm2 sur les plaques de fibrine standard.

./....

III - Dans aucun cas nous n'avons mis en évidence des produits de dégradation du fibrinogène

tant avant qu'après réalisation de l'anoxie tissulaire parmi les différents groupes de sujets.

IV - Résultats des dosages du plasminogène par l'étude de sa résistance à la streptokinase.

- Pour les témoins

Leur taux de base se situe entre 90 % et 120 %. Nous avons noté pour 7 d'entre eux une nette augmentation du taux du plasminogène à 150 % - 180 %. Pour un seul, M. BOU ... , dont le taux de base était plus élevé, à 150 %, est resté à 150 % après anoxie tissulaire.

- Pour les malades ayant eu des antécédents de thromboses

nous avons trouvé :

- Chez Mme UPM et M. TRI ... une augmentation de leur taux de 100 % à 160 % après anoxie tissulaire.

  Le taux de plasminogène de M. BEL ... n'a subi aucune variation.

- Il en a été de même pour les deux malades atteints de maladie thromboembolique.

Analyse des résultats

Chez 7 témoins sur 8, nous avons induit une activité fibrinolytique par anoxie tissulaire qui s'est traduite par :

- un raccourcissement du temps de lyse des euglobulines
- une augmentation des surfaces de lyse sur les plaques de fibrine standard et par une augmentation du taux du plasminogène.

Ce dernier point doit être discuté, car nous devrions trouver une diminution du plasminogène, puisque ce dernier se transforme en plasmine. Mais certains auteurs ont fait jouer un rôle aux globules blancs, ceux-ci étant lysés lors de l'occlusion veineuse.

Les malades ayant des antécédents de thrombo-phlébites

- deux se sont comportés comme les témoins
- un comme le groupe suivant :

Chez nos deux malades atteints de maladie thromboembolique, explorés à deux reprises : nous n'avons trouvé aucune variation dans les différents tests avant et après anoxie.

Un de nos témoins a présenté le même type de réponse.

Nous pouvons conclure à une différence significative entre les témoins et les sujets atteints de maladies thromboemboliques, où nous avons trouvé 100 % d'anormaux. Les sujets ayant des antécédents de thrombo-phlébites, se répartissent dans les 2 groupes après réalisation de l'anoxie tissulaire, tantôt comme les sujets normaux, tantôt comme les sujets atteints de maladie embolique.

LYSE DES EUGLOBULINES

I - Témoins	Prélèvement avant toute épreuve	Prélèvement après l'épreuve d'anoxie au bras opposé	Prélèvement après l'épreuve d'anoxie au bras occlu	Taux du plasminogène dosé par sa résistance à la streptokinase	
				Avant épreuve d'anoxie	Après épreuve d'anoxie
Melle DUC ...	6 h	3 h 30'	55'	110 %	180 %
Melle LEC ...	3 h	3 h	1 h 20'	100 %	180 %
Melle LAC ...	4 h 30'	4h 30'	1 h 15'	110 %	150 %
Melle DUP ...	3 h 45'	3 h 30'	1 h 45'	90 %	150 %
Melle CAU ...	4 h	4 h	1 h 15'	90 %	160 %
Mr. BOU ...	3 h 30'	3 h	3 h	150 %	150 %
Mr. PIR ...	3 h 15'	3 h	40'	120 %	170 %
Mr. GIL ...	5 h	4 h 30'	1 h 45'	100 %	160 %
II - Patients ayant fait des accidents de phlébothromboses					
Mme UPE ...	5 h	4 h 30'	1 h 45'	100 %	140 %
Mr. THI ...	4 h	4 h	1 h 30'	95 %	150 %
Mr. BEL ...	4 h	4 h	3 h	90 %	100 %
III - Nos deux cas de malades thromboemboliques					
Mme BEAU ...	3 h 30'	3 h 30'	3 h 30'	90 %	110 %
Mr. MAC ...	4 h 5 h 30'	3 h 30' 5 h 30'	4 h 5 h 30'	80 %	100 %
IV - Un cas de déficit en facteur XII (Hageman)					
Mr. DEG ...	3 h 30'	3 h	45'	150 %	180 %

TABLEAU N° 5

Noms	P D F	Plaques de fibrine Standard				Plaques de fibrine chauffée			
		Surface de lyse en mm2				Surface de lyse en mm2			
		avant anoxie		après anoxie		avant anoxie		après anoxie	
		Témoin	Malade	Témoin	Malade	Témoin	Malade	Témoin	Malade
Melle DUC ...	3,4	24	20	25	110	20	20	20	54
Melle LEC ...	8	25	25	25	81	20	24	20	49
Melle LAC ...	6	16	40	30	120	25	25	24	48
Melle DUP...	3,4	12	16	15	72	9	15	12	42
Melle CAU...	3,4	20	16	20	108	12	16	16	88
Mr. BOU...	6	36	42	36	42	30	35	25	42
Mr. PIR...	3,4	24	25	20	121	9	20	9	36
Mr. GIL...	3,4	20	30	25	81	16	20	15	42
Mme UPE...	3,4	12	16	16	80	15	16	20	42
Mr. THIL...	6	15	20	20	100	16	25	15	30
Mr. BEL ...	6	25	24	24	30	16	20	16	25
Mme BEAU...	8	30	25	25	30	20	24	20	25
Mr. MAC ...	6	24	16	16	36	20	25	25	24

TABLEAU N° 6

| | | |

Discussion

Deux mécanismes peuvent être responsables de cette anomalie d'activation du plasminogène par l'activateur tissulaire après l'anoxie

Il peut s'agir :

- soit d'un défaut de synthèse de l'activateur au niveau des parois veineuses.

- soit d'une absence de libération de ce facteur par les cellules endothéliales pendant l'anoxie.

Pandolfi et I.M. Nilsson (82-83) par la méthode autographique de Todd ont fait une estimation semi-quantitative de l'activité fibrinolytique de la veine saphène interne, des veines superficielles du bras et des veines thrombosées de la jambe, prélevée par biopsie, avant et après une anoxie tissulaire du système en activateurs du plasminogène localisés, dans les parois du vaisseau, et la survenue des thromboses.

Il peut être intéressant de se souvenir que les thromboses veineuses sont beaucoup moins fréquentes dans les bras où l'activateur tissulaire du plasminogène est plus élevé, que dans les membres inférieurs où le taux est plus faible.

Il se pose alors la question de savoir si la diminution significative du contenu en activateur tissulaire des veines des sujets ayant des antécédents de thromboses par rapport aux sujets témoins apparemment sains:

- est préexistante à la survenue des phlébites
- ou si elle est un phénomène concomitant
- ou si elle est une conséquence de la thrombose

./...

Conclusion

Dans le but de trouver un substrat biologique au déclenchement de cette maladie très particulière et rare que représente la maladie thromboembolique, atteignant le sujet jeune, se caractérisant par des thromboses profondes extensives, des migrations emboliques, surtout pulmonaires dont l'insuffisance cardiaque ventriculaire droite est quelquefois l'aboutissant. Nous avons, chez deux sujets atteints de cette maladie, explorer l'activation du système fibrinolytique local sous l'influence de l'anoxie. L'étude de 14 témoins nous a montré, chez 13, une augmentation de l'activité fibrinolytique mesurée par le temps de lyse des euglobulines sous l'influence de l'anoxie tissulaire réalisée par la pose d'un garrot.

Parallèlement, à la diminution du temps de lyse des euglobulines, nous avons noté une augmentation de sa surface de lyse des plaques de fibrine en présence des euglobulines du malade et l'augmentation de l'activateur du plasminogène. Par contre, nous n'avons pu mettre en évidence dans aucun des cas de produits de dégradation du fibrinogène.

Un seul témoin, apparemment sain, n'a montré aucune réponse après la même épreuve d'anoxie tissulaire.

De même, nous n'avons observé aucune exagération de la fibrinolyse après occlusion veineuse chez nos deux sujets atteints de maladie thromboembolique, comme s'il existait chez ces sujets un défaut de libération (ou de production) de l'activateur tissulaire qui passe normalement dans la circulation après occlusion veineuse.

Monsieur BEL ... qui avait fait une embolie pulmonaire et une phlébite, mais dont les fonctions plaquettaires étaient normales, a présenté le même type de réponse. Etant donné le rapport 2 sur 2 des sujets.atteints de maladies thromboemboliques, présentant cette absence de réponse à l'anoxie, alors que seul un témoin sur 8 était dans le même cas, nous pouvons penser avoir mis en évidence un désordre biologique indiscutable.

Cette diminution de l'activité du système fibrinolytique est-elle un élément favorisant l'installation des thromboses ? ou est-elle un symptôme concomitant ? Nous ne pouvons encore le dire. L'étude faite par Pandolfi et Nilsson I.M. (n° 43) semble montrer que cette absence d'activateur tissulaire dans les parois veineuses des membres inférieurs des sujets qui ont fait des accidents thromboliques va dans le même sens que nos constatations.

Il serait donc particulièrement intéressant de suivre l'avenir du témoin qui semblait avoir un déficit primaire en activateur tissulaire du plasminogène.

La survenue d'une thrombose ferait penser que l'anomalie que nous avons constamment retrouvée chez nos malades précèderait et favoriserait la survenue des phlébothromboses.

BIBLIOGRAPHIE

1 - ALEXANDER. B.-MEYERS. L-GOLDSTEIN. R-GGUREWITCH. V-GRINSPOON. L-Elevated SPCA (Convertin in pregnancy; its possible rôle in pathogenesis of thromboembolism; J.Clin.Investig. 1954.33.914.

2 - ALI. S.Y-EVANS. L-Purification and properties of tissue activator of plasminogen.Biochem. J. 1967.107.293.

3 - ALKJAERSIG. N-Henry Symposium on BLOOD Platelets. Ed.Brown and Co. Boston 732.329-336.1961.

4 - ALKJAERSIG. N.T.-The purification and properties of human plasminogen. Biochem. J.1964.93.171.

5 - ALTEMEYER. W.A-HILL.E-FULLEN.W.D.- Acute and recurrent thromboembolise disease New concept of etiology-Ann.Surg. 1969.170.547-558.

6 - AMERY. A-VERMYLEN.J-MAES.H-VERSTRAETE.M-Enhancing the fibrinolytic activitity in human blood by occlusion of blood vessels.Thrombo. Diath.Hemorrh.1962.7.70.

7 - ASTRUP.T.S.-Tissue activity of plasminogen.Fed.Proc. 1966.25.42.

8 - ASTRUP.T.S.-DARLING.Mesurement and properties of antitrombin.Acta. Physiol. Scand. 1942.4.293.

9 - ASTRUP.T.S.-MULLERT.S-Méthodes des plaques de fibrine.Arc.Biph. 1952.40.346.

10 - ATA.M-AZEEN.P.S.-TIGHE.J.R- The influence of venous occlusion on the fibrinolytic activity of blood.Clinical.Sciences.1964.27.357.

11 - BETTEX-GALLAND.M.-LUSCHER.E.F-Thrombosthenin : the contractil protein from blood, platelets and its relation to other contractle protein.Adv.Protein.Chem. 1965.20.I.

12 - BLIX.S-Acta.Med.Scand.171.83.1962.

13 - BUDZINSKI.A.Z-STAHL.M-KOPEC.M-LATALLO.Z.S-WEGRZYNOWITCH.Z-KOWALSKI.E High molecular weight products of the late stage of fibrinogen proteolysis by plasmin and their structural relation to the fibrinogen molecule.Biochem. Biophys.Acta. 1967.147.313.

14 - BYGDEMAN.S-ELLIASHON.R-JOHNSON.S.R.-Relationship between post operative changes in adenosine-diphosphate induced platelet adhesiveness and venous thrombosis.Lancet, 1966.I.1301.

./...

15 - CAEN.J-Rôle des plaquettes dans l'hémostase et la thrombose J.Med. de Caen. 1968 1.35-47.

16-17-CAEN J.MICHEL.H - Activité agrégante du sérum (plasma défibriné par la thrombine) Revue Franç.Et. Clin.Biol. 1964.9.1001

18 - CAEN J.-SINAKOS.Z - SULTAN Y - VAINER H - BERNARD J. Les troubles du fonctionnement des plaquettes dans les leucémies myéloïdes chroniques. Nouv. Revue Franç. Hémat. 1966.6.719.

19 - CASTALDI P. A. - LARRIEU M.J.- CAEN J - Platelet factor 3 availability and Factor XII activation in thrombasthenia. Nature 1965. 207.422.

20 - BYGDEMAN S. - WELLS R. - Studies of platelet adhesiveness blood viscosity and the microcirculation in patients with thromboembolism disease. Atheroscl.Research 1969.10.533.

21 - CHAKRABARTI R.- BIRKS P.M.- CEARNLY R. - Origin of blood fibrinolytic activity from vein and its bearing on fate of venous thrombi. Lancet. 1963.I.1288.

22 - CHICHE P. - La maladie thromboembolique pulmonaire. Monographies du collège de Médecine de Paris. Expansion.

23 - CHICHE P. - STMOU C. - MICHAPOULOS C. - Embolies pulmonaires et phlébothromboses primitives cliniquement latentes. Sem. HOP. Paris 1954.30.2.

24 - CLARKE R.J. - ORANDI A. - CLIFFTON E.E - Induction of fibrinolysis by venous occlusion. Angiology. 1960.II. 367.

25 - XIème congress of the international society of haematology. Held at University of Sydney. August 1966.

26 - CONNOR W.E. - HOAK J.C.- WARNER E.D. - Massive thrombosis produced by fatty acid infusion. J.Clin. Investig. 1963.42.6.860.

27 - CONSTANTINI C. - SPOTTL. F.- HOLZKNECHT F. - BRAUNSTEINER H. On the rôle of stable plasminogen activator of venous wall in occlusion induced fibrinolytic state. Thromb.Diathes.Haemorrh. 1970.22.3.544.

28 - DAVIDSON F.M. - Activation of plasminogen by staphylokinase : comparaison with streptokinase. Nature 1960.185.626.

29 - DAVIES M.C. - ENGLEBERT M.E. - DE RENZO E.C. - Interaction of streptokinase and human plasminogen I.Combining of streptokinase and plasminogen observed in the ultracentrifuge under a variety of experimental conditions. J. Biol.Chem. 1964.239.2651.

30 - DUPONT B - PONY J.C. - LE BIHAN G. - LE BORGNE P. - Maladie phlébothrombosante et magnesium. Sem. hop. 1969.45.3048.3054.

./...

28 - DAVIDSON F.M. - Activation of plasminogen by staphylokinase : comparaison with streptokinase. Nature, 1960.185.626.

29 - DAVIES M.G. - BY LEBART M.G. - ON EEZE E.C. - Interaction of streptokinase and human plasminogen I.Combining of streptokinase and plasminogen observed in the ultracentrifuge under a variety of experimental conditions. L.Biol.Chem. 1944.239.2651.

30 - LOUGAT P. - LONT J.C. - LE BIHAN G. - LE BORGNE P. - Maladie phlébothrombosante et magnesium. Sem. hop. 1969.45.3048.3054.

22 - CHICHE L. - La maladie thrombosmbolique pulmonaire. Mon graphies du collège de médecine de Paris, Expansion.

31 - DURLACH.J - Rôle antithrombotique physiologique du magnésium. Coeur et Med. Int. 1967.6.2.213.

32 - EGEBERG.O.- Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. Thrombo.Diathes. Haemorrh. 1965.13/4.516-530.

33 - FLETCHER.A.P.-FIEDERMAN.O-MOORE.D-ALKJAERSIG.N-SHERRY.S.- Adnormal plasminogen plasmin system activity (fibrinolysis) in patients with hepactic cirrhosis and consequences. J.Clin. Invest. 1964.43.681.

34 - FOX. F.J.-WIDE F.-KILLANDER.J-GENSELL.C - Determination of fibrinogen and fibrinolysis products in human plasma by an immunochemical meth. Scand. J.Clin.Lab. Invest. 1965.17.347.

35 - GAARDER. A.-JOHNSON.J-JALAND.S - HELLEM.A - OWREN.P.A-Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets. Nature. 1961.192.531.

36 - GESNER.B.M-JEWIN.C.R. - Production of heparinase by bacteroïde. J. Bact. 1961.81.595.

37 - GOTTLIER.P. M-TURNOFF.-ZIMMERMAN.-CHAMBLIN - Idiopathic thrombophlebitis migrans with usual manifestation.Ann. Intern. Med. 1950. 33.1975.

38 - GRAM.H.C-Journ.Biol.Chem. 1921.49.279.

39 - [illegible] Bull. Johns. Hopk. Hosp. 76.245.1955.

40 - HASLAM R.J-MILLS. D.C B.- The adenylatekinase of human plasma, erythrocytes and platelets in relation to degradation of adenosine diphosphate in plasma. Biochem.J.1967.103.773.

41 - HELLEM.A.J.- The adhesiveness of human blood platelets in vitro. Scand. J.Clin. Lab. Invest. 1960.12. suppl. 51.

42 - HENRY.R.L. - Leucocytes and thrombosis. Thromb. Diath. Haemorrh. 1965.8.35.

43 - HIRSH.J.Mc. BRIDE J.A.- Increased platelet adhesiveness in reccurent venous thrombosis and pulmonary embolism. British M.J.II 5465.797. 1965.

44 - HOLEMANS - Increase in fibrinolytic activity by occlusion (venous). J.Applied.

45 - HOLEMANS. R.HAROLD.R-POBERTS - Hageman factor and in vivo activation of fibrinolysis.J. Lab. Med. 1964.64.5.778.

./...

46 - HOLEMANS.R-TYSINGER.A-MURRAY.F. Site of origin of increased fibrinolytic activity during venous occlusion. Proc.Soc.Exp-Biol.Med. 1965.118.488.

47 - HOLEMANS.J- Pulmonary embolism do to quiet venous thrombosis and simulating cardiac and pulmonary disease. New England J. Med. 1943.229.309

48 - HONOUR.A.J - MITCHELL J.R.A.- Platelet clumping in injured vessels.Brit. J.Exp. Path. 1964.45.75.

49 - HOVIG.T.- The effect of calcium and magnesium on rabbit blood platelet agragation in vitro. Thromb. Diath. Haemorrh. 1964.12. 179.

50 - HUGUES.J.LAPIERRE.C.M - Nouvelles recherches sur l'accolement des plaquettes aux fibres de collagène. Thromb. Diath.Haemorrh. 1964.2.327.

51 - IATRIDIS.P.G-IATRIDIS-PERGENSON H.J.- The rôle of HF (factor XII) in pathogenesis of the thrombotic state induced by venous occlusion. Throm.Diath. Haemorrh. 1966.16.207.

52 - JACOBSEN C.D.- Proteolytic capacity in human plasma. Measurement of proteolytic activity in the presence of natural inhibitors and study of the individual variations. Scand. J.Clin.Lab. Invest. 21.216.1968.

53 - Von KAULA K.N.-Non enzymatic activation of the fibrinolytic enzyme system Fed. Proc. 1966.25.57.

54 - Von KAULA E. - Von KAULA K.N. - Antithrombin III and diseases. Amer. J. Clin. Pathol. 1967.48.69.

55 - KJAERHEIM. F. - HOVIG.T. - The ultrastructure of haemostatic blood platelet plugs in rabbit mesenterium. Thromb. Diath. Haemorrh. 1962.7.1.

56 - KLINE.D.L- FISHMAN.J.B - Improved procedure for isolation of human plasminogen. J. Biol. Chem. 1961.236.3232.

57 - KOWALSKI E. - Fibrinogen derivatives and their biologic activities. Semin. Haemat. 1963.I.45.

58 - KRAUSE.R.J - CRANLEY J.J-HALLABA. M.A.-STASSER.-HAFNER - Caval ligation in thromboembolism disease. Arch.Surg. 1962.87. 184.

59 - KUCINSKI.C.S - FLETCHER.A.P- SHERRY. S. - Effect of urokinase antiserum on plasminogen activators. Demonstration of immunologic dissimilarity between plasma plasminogen activator and urokinase. J. Lab.Invest. 1968.47.1238.

./...

60 - KULEY.M. - INCEMAN. S. - Thrombophlebitis migrans. Turk.Tip. com. Medc. 1947.13.524.

61 - KWAAN.C.H.- Mac MADZCAN. - Plasma fibrinolytic activity induce by venous occlusion. Clin. Sciences. 1956.15.245.

62 - LEGRAND.Y. CAEN J.- ROBERT.L. - Collagènes purifiés et plaquettes sanguines (effet de certains "osides" sur l'adhésion et l'ágrégation plaquettaire. Sté Franç. Hemat. 20.3.1967.

63 - LEVY-TOLEDANO. S. - CAEN J. - Nouvelles données sur la dissociation de la super-précipitation et de l'activité ATPasique de la thrombosthénine, préparée à partir de plaquettes humaines congelées et lyophilisées. C.R. Acad. Sc. 1966.263.1280.

64 - LUSCHER E.F.- Platelets in haemostasis and thrombosis. Brit. J. Hemat. 1967.13.1.

65 - MAC FARLANE. R.G.PILLING. J.-Fibrinolytic activity of normal urine. Nature 1947.159.779.

66 - MARDER. V.J - LARRIEU.M.J - SHULMAN. N.R - Molecular weight and anticoagulant activity of intermediate products of fibrinogenolysis. Blodd .1966.28.985.

67 - MARDER. V.J - SHULMAN.N.R. - Characterization of intermediate degradation products of plasmin induced fibrinogenolysis. Fed. Proc. 1967.26.537.

68 - MARENS. A.J-ZUCKER. - FRANKLIN D.- SAFIER.L.B- ULLMAN - Studies of human platelet granules and membranes. J.Cli. Invest. 1966. 45.14.

69 - MERSKEY. C.-KLEINER.G.J.- JOHNSON.A.J - Quantitative estimation of split products of fibrinogen in human serum, relation to diagnostis and treatment. Blood. 1966.28.1.

70 - MERSKEY. C.A. rapid and simple method for fibrinolytic measures split in human serum. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1969.131.n°3.

71 - MILSTENE. J.H-J. - Immunol. 1941.48.109.

72 - NILSSON.I.M. - Changes in the coagulation and fibrinolytic systems predisposing to thrombosis. Acta. Chirurgica. Scand. 1968.II.387.

73 - NILSSON.I.M. - KROOK.H - STENBY.N.H. - SORENBERG. E. - SODERSTROM. N. - Severe thrombotic disease in a youg man with bone narrow and skeletal changes and with a high content of an inhibitor in fibrinolytic system. Acta. Med. Scand.1961. 169.323.

./...

74 - NORDOY.A.-CHANDLER.A.B. - The influence of dietary fats on the adenosine diphosphate induced platelet thrombosis in the rat. Scand. J. Hemat. 196[illegible] I. 202.

75 - NORDOY.A.- CHANDLER.A.B. - Platelet thrombosis induced by adenosine diphosphate in the rat. 1964.1.16.

76 - NORDOY.A.- CHANDLER.A.B. - The influence of the hypercephalinaemia on the adenosine diphosphate induced thrombosis in the rat. Scand. J. Hemat. 1965.2.148.

77 - NORMAN.P.S. - Antiplasmins. Fed. Proc. 1966.25.63.

78 - NOSSEL [illegible] - The contact phase of blood coagulation. Blackwell. Oxford. 1954.95.

79 - O'BRIEN.J.R. - Platelet agragation some effects of the adenosine diphosphate, thrombin, and cocaine upon platelet adhesiveness. J.Clin. Path. 1962.15.446.

80 - ODEGAARD.A.E.- SHALHEGG.[illegible].A.- HELLEM. A.J.- Investigation on adenosine diphosphate (ADP) induced platelet adhesiveness in vitro. Part III : the inactivation of ADP in plasma. Thromb. Diath. Haemorrh. 1964.II. 317.

81 - OWREN. P.A. - ORAL contraception and the blood coagulation British. Med. J. 196[illegible] 220.

82 - PANDOLFI. M.- ICACSON J. - NILSSON I.M. - Low fibrinolytic activity in the walls of veins in patients with thrombosis. Acta. Med. Scand. 196[illegible] [illegible].1.

83 - PANTOLA[illegible] - [illegible] B.- ICARSON S. - Fibrinolytic activity of human veins. Lancet 1967.2.127.

84 - Plasmatic and platelet antiplasmin and antiactivator.Tr Thromb. Diath. Haemorrh. 1969.21.35.

85 - POLLEY.L. - Factor VIII and heparin in thrombosis. J. Clin. Path. 1959.12.331.

86 - POOLE J.C.F. - FRENCH J.L. - CLIFT.W.J. - The early stages of thrombosis.J. Clin. Path. 1963.16.523.

87 - RATNOFF.O.D. - PTA deficiency and Hageman trait. Scand. J.Hemato.I. Series Hemato. 1965.7.29.

./...

88 - RAYNER.P.A. - RASTEVAS.I. - Fibrinogen PDF identification J. Lab. Clin. Med. 1969.73.4.586.

89 - RIMON. A.- SHAMASH.Y - SHAPIRO.B. - The plasmin inhibitor of human plasma. J.Biol. Chem. 1966.241.5102.

90 - SALZMAN.E. - CHAMBERS.D.A. - NERI.L.L. - Incorporation of labelled nucleotides and agregation of human blood platelets. Thrombo. Diath. Haemorrh. 1966.15.52.

91 - SHAMASH.Y. - RIMON.A. - The plasmin inhibitors of plasma. A method for their estimation. Thromb. Diath. Haemorrh. 1964.12.119.

92 - SINAKOS.Z - CAEN.J. - Le comportement des plaquettes chez le rat. Thromb. Diath. Haemorrh. 1966.16.163.

93 - SHERRY S. - Present concepts of fibrinolytic system. Series Haemotologica. 1965. Ed. Bjoïlemar Copenhague Hinbsgaard,70.

94 - SHERRY - ROBERT.F. - LINDERMEYER.A.P. - FLETCHER. - Norma ALKJORESIG Enhanced fibrinolytic activity.J. Clin. Invest. 38.810.1959.

95 - SPAET.T.H - Studies on the formation of platelet plug. J.Clin. Invest. 1963.42.981.

96 - SPAET.T.H. - Vascular factors in the pathogenesis of thrombosis. Inter. Symposium on thromboembolism. Bâle. Spt. 1965.

97 - SPAET.T.H - KRAPATKIN.M. - Effect of intravenous blood thromboplastin intermediates on clotting in rats. Amer.J. Physiol.1958. 195.77.

98 - SPITTEL.J.A. - PASCUZZI.C.A. - THOMPSON.J.H. - OWEN.C.A. - Accelaration of early stages of coagulation in certain patients with occlusive arterial or venous disease. Use of modified throboplastin generation test to evaluate acceleration. Proc. Mayo. Clin. 1960.35.37.

99 - SWAN. H.T. - Fibrinolysis related to âge in men.British.J.Haemat. 1963.9.311.

100 - TATARSKY.I. - SINAKOS.Z. - LARRIEU.M.J. - BERNARD J. - Leucocytes et fibrinolyse. Nouv. Revue Française.Hemato.1967.7.95.

101 - TIGHE.J.R. - SWAN H.T. - Fibrinolysis and venous occlusion. Clin. Sciences.1963. 25.219.

./...

102 - TODD.A.S. - Localization of fibrinolytic activity on tissues. Brit. Med. Bull. 1964.20.210.

103 - TODD.A.S. - Histological localization of fibrinolysis activaor. J.Path. Bact. 1959.78.281.

104 - WAALER.B.A. - Contact activation in the intrinsic blood clotting system. Scand. J. Clin. Invest. 1959. Suppl. 37.11.

105 - WARNER.ED. - HOAK.J.C and al. - The rôle of fatty acid in platelet agragation and thrombosis. Transaction of the conference of Chapel Hill 1966 Stree Egart, Schattauer. 1966. 249.259.

106 - WESSLER.S. - Stasis hypercoagulability and thrombosis. Fed. Proc. 1963.22.1366.

107 - WESSLER.S. - The rôle of the man coagulation factors in serum induced thrombosis. J.Clin. Invest. 1960.39.269.

108 - WESSLER. S. - THYE.YIN E.E. - On the mechanism of thrombosis. Progress in Haemat. VI .201.1969.

109 - WESSLER S.-YIN E.T. - GASTON.L.W. - NICOL-A distinction between the rôle of precorsor and activated forms of clotting factors in genesis of stasis thrombosis. Thromb. Diath. Haemorrh.1967.18.12.

110 - WILLIAMS.J.R.B. - The fibrinolytic activity of urine. Brit.J. Exp. Path. 1951.32.530.

111 - WIRCHOW.R. - Gesammelte Abhandlüngen zur wissenschaftlichen Medizin, Frankfurt.

112 - JAQUES.L.B. et FISCHER L.M. 1960 - Platelet serotonin as a factor in hemostasis - Arch. Int. Pharmac. Therapic 123.325.

113 - O'BRIEN J.R. - 1964 - Variability in the aggregation of human platelets by adrenaline. Nature 202.1188.

114 - SAWYER.P.N. - RAARDON J.H. - et OGONIAK .J.C. 1965 - Irreversible electrochemical precipitation of mammalian platelets and intravascular thromboses - Proc. Nat. Ac. Sc. 53.200.